



Oxydation et dégradation de l'ascorbate chez la tomate et impact sur la croissance et le métabolisme

Vincent Truffault

► To cite this version:

Vincent Truffault. Oxydation et dégradation de l'ascorbate chez la tomate et impact sur la croissance et le métabolisme. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, 2015. Français. NNT : 2015AVIG0671 . tel-01299587

HAL Id: tel-01299587

<https://theses.hal.science/tel-01299587>

Submitted on 7 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée pour obtenir le grade de **Docteur en Sciences**
de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse
Spécialité : Sciences Agronomiques

Oxydation et dégradation de l'ascorbate chez la tomate et impact sur la croissance et le métabolisme

par **Vincent TRUFFAULT**

Soutenue publiquement le 12 novembre 2015, devant le jury composé de

Stephen FRY	Professeur à l'Université d'Edimbourg	Rapporteur
Charles ROMIEU	Directeur de recherche, INRA Montpellier	Rapporteur
Pierre BALDET	Chargé de recherche, INRA Bordeaux	Examineur
Félicie LOPEZ-LAURI	Professeure à l'Université d'Avignon	Examineur
Hélène GAUTIER	Directrice de recherche, INRA Avignon	Directrice de thèse
Rebecca STEVENS	Chargée de recherche, INRA Avignon	Directrice de thèse

Ecole doctorale

Agrosciences et Sciences (ED536), Sciences, Technologie, Santé

Laboratoire

INRA-UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL), Avignon

INRA-UR 1115 Plantes et Systèmes de cultures Horticoles (PSH), Avignon

Partenaire financier

Région Provence Alpes Côte d'Azur

Gautier Semences



L'expression la plus excitante à entendre en sciences, celle qui annonce de nouvelles découvertes, ce n'est pas « Eureka! » mais « Tiens, c'est drôle... »

Isaac Asimov

Auteur américano-russe, professeur de biochimie à l'université de Boston

Ne dites pas que vous n'avez pas le temps. Vous avez exactement le même nombre d'heures par jour qu'ont eu Pasteur, Michel-Ange, de Vinci ou Albert Einstein...

H. Jackson Brown Jr

Auteur américain, « Life's Little Instruction Book »

Remerciements :

La réalisation et le bon déroulement de ma thèse n'auraient pu être effectués sans l'aide, le soutien et la bonne humeur des personnes formidables que j'ai eu l'honneur de côtoyer durant ces 3 années de thèse. Ce fut pour moi une expérience fabuleuse et enrichissante, et un grand bonheur de converser avec toutes les personnalités rencontrées. Je m'attèle donc avec plaisir à cette rédaction (somme toute formelle mais sincère) des remerciements.

Moi et mon travail de thèse nous sommes retrouvés au centre d'un triangle bienveillant et compétant tout au long de ces 3 années. Je suis très fier d'avoir pris mon envol dans la vie professionnelle et personnelle avec (des) elles :

- **A Rebecca** : co-directrice de thèse, tu es bien plus que ça pour moi. Tes méthodes d'encadrement ont été parfaites pour moi. Tu as ce don de laisser l'étudiant que tu encadres aller au bout de son raisonnement, toujours d'écouter ses idées (bonnes ou mauvaises) et de répondre de manière positive et cohérente. Un régal de réfléchir avec toi. Jamais une remarque négative, il faut toujours avancer, peu importe les (nombreux) problèmes rencontrés (ils font déjà partie du passé), pour appréhender les mécanismes de ces plantes que l'on ne comprend pas toujours (les mystères du vivant). Tu te rends tout le temps disponible quand j'ai une question, une interrogation. Tu as été d'une aide formidable dans l'élaboration des « histoires » que raconte ce manuscrit. Tu as une curiosité incroyable et l'on a pu discuter de millions de choses diverses et variées au cours de cette thèse. Je ne remerciais pas ton talon d'Achille capricieux, qui nous a fait perdre quelques minutes (malgré tous tes efforts pour accélérer) lorsqu'il fallait aller voir les plantes en serre. Merci à Bill Nighy, dont la simple évocation de son nom te donne le sourire et égaye ta journée ! On aura également beaucoup ri ensemble, tu as un humour (« what is brown and sticky ?.....a brown stick !) et un sourire communicatif.

Rebecca, merci pour tout !

- **A Hélène** : Tu es la raison pour laquelle je suis venu à Avignon (j'avais lu certains de tes papiers lorsque j'étais en Licence à Rennes et je les avais trouvés fort intéressants) et puis par un heureux hasard je t'ai rencontrée lorsque j'ai postulé à une offre de stage en Master 2 (où ton nom n'apparaissait pas) sur la qualité de la tomate en collaboration avec le CTIFL de Carquefou. Je crois que le courant est bien passé et j'ai souhaité poursuivre le travail avec toi dans le cadre d'une thèse. Chose à laquelle je n'avais pas forcément pensé avant. Sans toi, je n'aurais sans doute pas postulé

pour un doctorat, et serais donc passé à côté de toutes ces joies et ces expériences enrichissantes ! Je ne t'en remercierais jamais assez. Pendant ma thèse, tu t'es révélée une parfaite directrice de thèse (malgré les nombreuses sollicitations auxquelles tu as du faire face en tant que directrice d'unité), souriante et attentive, avec toujours ce fourmillement d'idées et de propositions dans ta tête (même si ça débouchait très souvent sur plus de travail !). J'ai également participé à mes premiers colloques internationaux (ISHS Angers, POG Varsovie) avec toi, tu as donc accompagné tous mes premiers pas dans la recherche, une sorte de guide pour moi !

Hélène, merci pour tout !

- **A Gisèle** : Tu es une des personnalités les plus incroyables que je connaisse. Bien que ta manière de les formuler ait parfois été brutales, tes remarques et questions sur mes travaux de thèse (« et pourquoi tu fais ça ? et pourquoi tu fais comme ça ? A quoi ça va servir ? ») m'ont été fort utiles et ont amenés du réel dans des travaux parfois très fondamentaux. J'ai eu la chance de partager à la fois ton travail de qualité et ton caractère direct (et tempétueux par moment) lors des nombreuses manip pour lesquelles tu m'as apporté une aide indispensable. Ta bonne humeur et ta bonne volonté sont remarquables, je ne pouvais pas rêver mieux pour m'accompagner le matin au lever du soleil pour des prélèvements en serre, le soir au coucher du soleil pour des prélèvements en serre (et des sorties au pub Z), le week-end pour arroser mes plantes (et arroser l'été à l'ombre d'un murier avec de bonnes odeurs de grillades) et pour toutes ces autres choses effectuées durant des journées de travail normales ! Ta présence et tes discussions hors du cadre boulot ont été essentielles à ma santé mentale lors de ces 3 années de thèse. Je remercie également Michel, ton mari (pour sa franchise, ses blagues, et sa bonne humeur) et Mathis, ton fils (pour les conseils en musique électronique et son talent au jeu du palet qui me challengeait (un peu) plus que ta performance pitoyable à ce jeu). Merci à ton lapin également, dont l'état de santé aura représenté un fil rouge au cours de ma thèse.

Gisèle, Gisou, Gis, merci pour tout, et surtout ne change rien !

Une très grande gratitude envers les membres de mon comité de suivi de thèse qui ont suivi le cheminement de ma thèse avec bienveillance et conseils : **Pierre Baldet, Yves Gibon, Félicie Lauri, Frédéric Moquet, Guy Costagliola**. Les deux journées consacrées à mes comités de suivi de première et deuxième année resteront comme les plus enrichissantes de ma thèse.

Je remercie également les rapporteurs de mon jury de thèse Dr. **Charles Romieu** et Dr. **Stephen Fry** (ainsi que Félicie Lauri et Pierre Baldet) pour avoir accepté de critiquer mon travail de thèse.

Je vous ai évoqué ce triangle bienveillant et compétant au sein duquel j'ai évolué durant ces 3 dernières années. Au cœur de ce triangle, je me retrouve à voguer d'une extrémité à une autre, mais parfois je m'échappe de ce triangle pour rejoindre un univers chaleureux où je retrouve la **Tea Team** (Sandrine, Guillemette, Juliette, Thibault, Catherine) et les amis de la cantine. Parmi eux, il y a une personne sans qui je ne serais rien, qui m'a tout (je dis bien tout) appris : **Sylvie**, ma deuxième maman. Tu m'as adopté dès que j'ai posé le bout de mon orteil au sein de l'unité PSH. Tu m'as guidé (et parfois je t'ai guidé lors de randonnées au Toulourenc et à la Saint Victoire où tu galopais...derrière !), m'as fait rire, m'as écouté, m'as fait rire encore, as tenté de cuisiner un Kouign Aman, puis m'as carrément accueilli au sein de sa génial tribu familiale (Alain son mari, un type incroyable avec des crampes parfois ; ses deux fils Jérémy et Kévin(ou) avec qui j'ai pu partager quelques bons moments (randonnée, basket, broyage (!) et moly) et qui sont des amis désormais). Merci à ton père Sylvie, dont les aventures inimaginables (et la manière dont tu les racontes) resteront ancrées dans ma mémoire. Tu m'as appris à manipuler en laboratoire de la bonne façon et surtout tu m'as enseigné le dosage de la vitamine C, dosage au combien essentiel pour ma thèse ! Je n'aurais jamais pu obtenir cette thèse sans toi Sylvie. Et comme on dit, qui aime bien, charrie bien...je t'ai donc beaucoup charrié !

Merci à **Guy** pour ton enseignement sur la chromatographie gazeuse, la spectrométrie de masse et pour toutes ces bonnes (et mauvaises) idées dans l'élaboration des protocoles. Tu as fait partie de mon comité de suivi de thèse, tu as donc participé au bon déroulement de ma thèse par tes idées, tes connaissances mais également ta bonne humeur, qualités que j'ai largement appréciées.

Un très grand merci à **Sandrine** (membre fondatrice de la Tea Team), mon amie pour longtemps, pour les pauses thé nécessaires en été (à cramer la pelouse avec la théière) comme en hiver (au chaud à la cafèt), et tous les moments partagés en dehors de PSH : les films sur maxi-giga-écran, les discussions et soirées TopChef, les randonnées, ta piscine, les classements de dinosaures avec Liam, le quechua-style et tant d'autres moments !

J'adresse ma gratitude aux stagiaires qui ont participé de près (**Claire** et les micro-toms, **Elodie** et **Emmanuel**, stagiaires labo) ou de loin (**Kamal** et ses schémas à l'ancienne, à la craie sur tableau noir, pour nous expliquer la détection d'espèces paramagnétiques, **Marta**) à mon travail de thèse.

Je remercie le personnel du labo **Doriane, Patricia, Emilie** et les esclaves **Thibault** et **Thibault** pour leurs aides et pour l'extraordinaire ambiance, notamment lorsque la « hotte » est pleine !

Durant ces trois années, il y avait comme une douce ambiance flottant autour de moi (au bureau mais également en dehors). C'est pourquoi j'envoie mes remerciements pour l'éternité à **Julie** (et à Nico pour les multiples soirées) et à **Refka**, mes colocataires de bureau ; à **Kiki** pour son « parler » du Sud et ses « et coucou » à plein poumons dans les couloirs ; à **Guillemette** (et Valentin pour les soirées, le voyage à Dublin, je te garde définitivement comme amie pour toujours) ; à mes potes de Master **Charles, Jérémie** et **Pierre** ainsi qu'à **Laure**, pour être des amis fidèles et pour les soirées (crêpes) de décompression ; à mes potes du lointain Nord-Ouest (les bretons !!!) de la France qui sont venus me voir **Akash, Bob, Toyant, Ronan, Elise, Mickaël** ; à mes acolytes de randonnée **Justine** (et de sorties en tout genre), **Christopher, Marie-Noëlle**.

Un grand merci à mon groupe de vacances annuelles du Queyras pour ces moments de galère dans les montées avec les guêtres de Fourrier, de plaisir au sommet, d'euphorie dans les descentes et les doux moments des repas en gîtes : **Michel** notre guide, **Marie, Jérémie, Sarah, Benjamin, Marie-Anne, Béné, Jean-Michel, Fanny** et tant d'autres fous de la pente !

Je remercie ma famille d'être venue me voir dans le lointain sud et pour le soutien indéfectible.

Durant mon séjour à Edimbourg, j'ai également rencontré nombre de personnes qui resteront pour longtemps dans ma mémoire, je leur dédie donc les phrases suivantes :

I would like to thank warmly all the people who have contributed in some way to my project in Edinburgh University, and particularly Dr **Stephen Fry** who supervised my work at ECWG (Edinburgh Cell Wall Group) and for all of his wonderful advices I fully appreciated. My thanks also go to **Janice Miller** for her help and her joviality. Huge thanks for **Rebecca Dewhirst** for her availability and her help in all I've done in the lab. I will have done nothing without them!

Many thanks go to **Anne** and **Gosia**, my wonderful flat mates "of shame", and to **Jessie** and **Bart** for all good memories (Highlands, Burgers, Stirling Castle, Saint Andrews, (Dundee), Ceilidh dance, Haggis...). And to **Becca, Frank, Lenka, Pumi, Louise** and **Suzy** for Monday's cine club, Tuesday's pub quiz, Masquarade ball, Ceilidh dances and more... Hope to see you again!

Abréviations

ABA: acide abscissique

ADN: acide désoxyribonucléique

AI: invertase acide

AO: ascorbate oxydase (enzyme)

APX (et AA-px): ascorbate peroxydase (enzyme)

ARN: acide ribonucléique

AsA: molécule d'ascorbate réduite

ATP: adénosine triphosphate

CAT: catalase (enzyme)

CO₂: dioxyde de carbone

cOxT: cyclic-oxalyl-thréonate

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DHA: déhydroascorbate (molécule d'ascorbate oxydée)

DHAR: déhydroascorbate réductase (enzyme)

DKG: 2,3-diketogulonate

DTNB: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (ou réactif de Ellman)

DTT: dithiothréitol

Dw: Dry weight (matière sèche)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acide

ERU: érythrulose

Fw: Fresh weight (matière fraîche)

G6P: glucose-6-phosphate

G6PDH: glucose 6 phosphate déshydrogénase

GA: acide gibbérellique

GaLDH: L-galactose déshydrogénase (enzyme)

GCMS: chromatographie gazeuse et spectromètre de masse

GR: glutathion réductase (enzyme)

GSH: glutathion réduit

GSH-px: glutathion peroxydase

GSSG: glutathion oxydé

GuLO: gulono-1,4 γ-lactone oxydase (enzyme)

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

HPLC: chromatographie liquide à haute performance

HVPE: High-Voltage Paper Electrophoresis

MDHA: monodéhydroascorbate (espèce radicalaire)

MDHAR: monodéhydroascorbate réductase (enzyme)

miox: myo-inositol oxidase (enzyme)

MSTFA: N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide

Milieu MS: Murashige et Skoog

NAD(H): nicotinamide adénine dinucléotide oxydée (réduite)

NADP(H): nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée (réduite)

NEM N-ethylmaléimide

NI: invertase neutre

OH[•]: radical hydroxyle

OxA: oxalate

OxT: oxalyl-thréonate

PSI et PSII : photosystème I ou II

RNAi: ARN interférent

RPE: Résonnance Paramagnétique Electronique (ou EPR)

ROS ou ERO: espèces réactives de l'oxygène

SC: Scintillation Counting

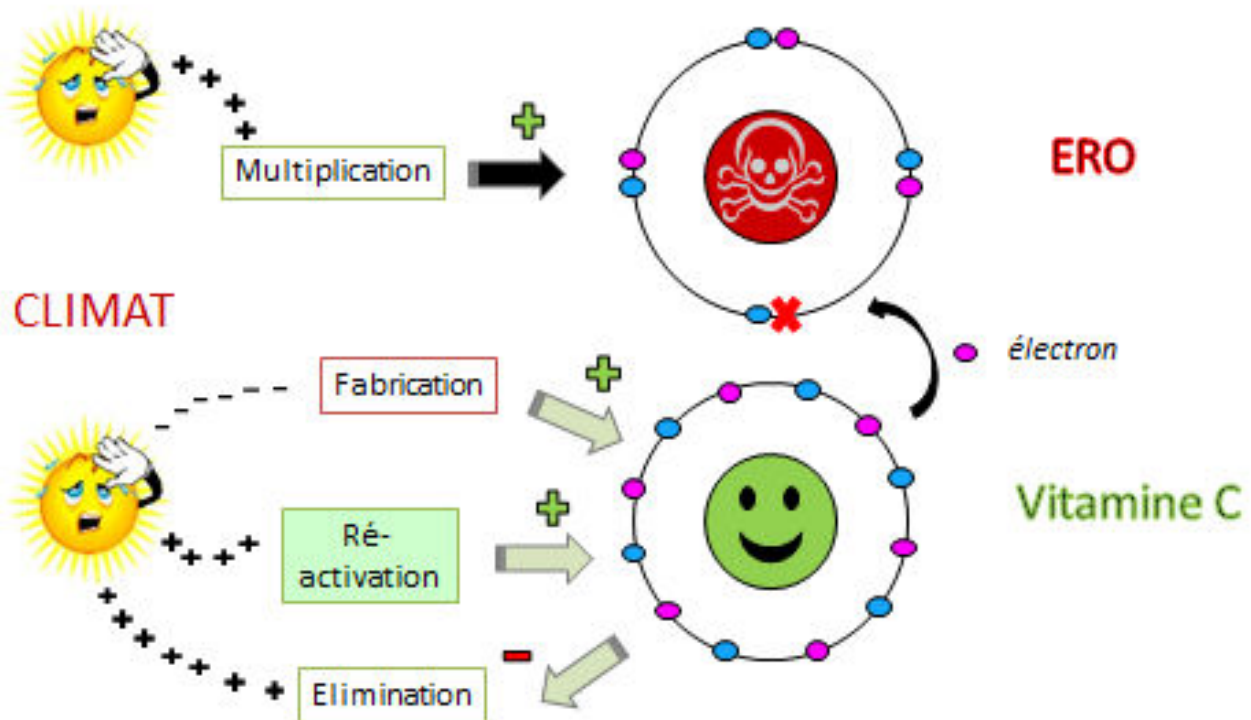
SOD: superoxyde dismutase (enzyme)

Tar: tartrate

TCA: Trifluoroacétique acide

Thr: thréonate

La vitamine C, un anti-ERO !



Slide présentée lors du concours Ma Thèse en 180 secondes

Texte déclamé lors de ma participation aux concours « Ma Thèse en 180 secondes » organisé par la Conférence des Présidents d'Université et le CNRS.

Le 04/04/2014 à Avignon.

Prix du Jury & prix du public lors de la finale locale ; Finaliste régional (2^{ème} position)

« Dans les petites usines des plantes où l'on fabrique de l'énergie à partir du CO₂ et de la lumière ; une pollution se répand: l'oxygène. L'oxygène n'est pas dangereux. Mais si jamais une fuite d'électrons s'écoule de notre usine, l'oxygène peut se transformer en poison. Si un électron s'agrippe à notre oxygène, cela va perturber sa structure chimique et aboutir à la génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène, ERO. Ce sont mes ERO du jour.

Un ERO est hyper-réactif, et il veut absolument marier son électron célibataire. Il va alors forcer l'union de son célibataire avec toutes sortes de prétendantes rarement consentantes. On dit alors que le ERO s'est réduit, c'est-à-dire qu'il a gagné un électron et s'est stabilisé, tandis que son élue est oxydée, elle a perdu un électron. Ce passage au célibat, ou oxydation, va mettre en jeu la vie de la plante.

Mais il y a bien une prétendante consentante, la vitamine C.

Elle saute sur n'importe quel célibataire, endurci ou non, et marie ses électrons dès qu'une ouverture se profile. La vitamine C est un anti-ERO parfait. Elle a en effet la faculté de céder un de ces électrons à un ERO, voire de réparer une élue oxydée sans impact nocif. En effet, la vitamine C se rend rarement compte de son état oxydé car elle est immédiatement ré-activée via un habile et peu couteux processus.

Mais, malgré son activité débordante, la vitamine C doit affronter de plus en plus de ERO. Le travail de ma thèse s'inscrit dans un contexte de changement climatique. Ces changements ne laisseront aux plantes que deux choix : fuir ou s'adapter à des conditions de température et de luminosité non optimales. A l'inverse, ces conditions vont entraîner la production exponentielle des ERO, avec un risque léthal pour la plante.

Pour contrer cette menace, les plantes m'ont contacté, moi et mon équipe, dans le but d'améliorer le potentiel défensif de la vitamine C en conditions de stress. Ni une ni deux, j'ai saisi ma loupe et me suis mis à surveiller la vitamine C du coin de ma paillasse. Pour mimer les futures conditions de croissance des plantes, j'ai déposé cette vitamine C sur du sable chaud avec le soleil au zénith. Et puis au frigo aussi. Bref, je l'ai tant traumatisé que ces retours me sont parvenus.

La chaine de fabrication de la vitamine C m'a prévenu qu'elle ne fonctionnait qu'avec de la lumière et qu'elle n'appréciait pas les températures chaudes. La voie d'élimination de la vitamine C m'a félicité m'indiquant que travailler dans le stress l'avait stimulée.

Le processus de ré-activation s'est révélé particulièrement intéressant. Il pourrait être capable de sauver la vitamine C d'une élimination en la ré-activant en conditions de stress. C'est donc une piste forte intéressante à suivre dans le but de proposer aux plantes du futur une solution clé en main d'adaptation aux changements climatiques.

Voilà, j'espère que je ne vous ai pas trop oxydé. Merci à vous ! »

Sommaire

INTRODUCTION

La Tomate	1
Botanique	1
Production	3
Qualité nutritionnelle et organoleptique	3
Le monde de la recherche et la tomate	5
Ascorbate	7
Histoire anthropocentrée de l'ascorbate	7
Chimie	8
Les plantes et l'ascorbate	13
<i>Synthèse</i>	13
<i>Oxydation</i>	17
<i>Recyclage</i>	17
<i>Dégradation</i>	21
<i>Variabilité de la concentration en ascorbate</i>	22
<i>Transport</i>	25
<i>Quels sont les facteurs abiotiques influençant la teneur en ascorbate dans la plante ?</i>	27
<i>L'ascorbate, une molécule aux multiples rôles</i>	31

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE 39

MATERIELS ET METHODES	41
Présentation du matériel végétal	42
Transformation génétique	43
Conditions de culture et suivi de la physiologie de la plante	43
Mesure de l'activité photosynthétique	44
Prélèvement et préparation d'échantillon	44
Extraction et dosage de l'ascorbate par microplaque	44
Extraction du liquide apoplastique	45
Extraction et dosage du glutathion par microplaque	46
Extraction et dosage des sucres solubles par HPLC	46
Préparation d'échantillon pour l'analyse métabolomique (GC-MS)	47
Dosage de la teneur en anthocyanes	50

Estimation de l'activité de l'enzyme MDHAR	50
Estimation de l'activité de l'enzyme AO	50
Extraction des enzymes liés au métabolisme des sucres	51
Estimation de l'activité de l'enzyme AI	51
Estimation de l'activité de l'enzyme NI	52
Estimation de l'activité de l'enzyme G6PDH	52
Détection et dosage du radical MDHA	52
Quantification de la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes	53
Méthode d'identification des produits de dégradation de l'ascorbate	54

CHAPITRE 1

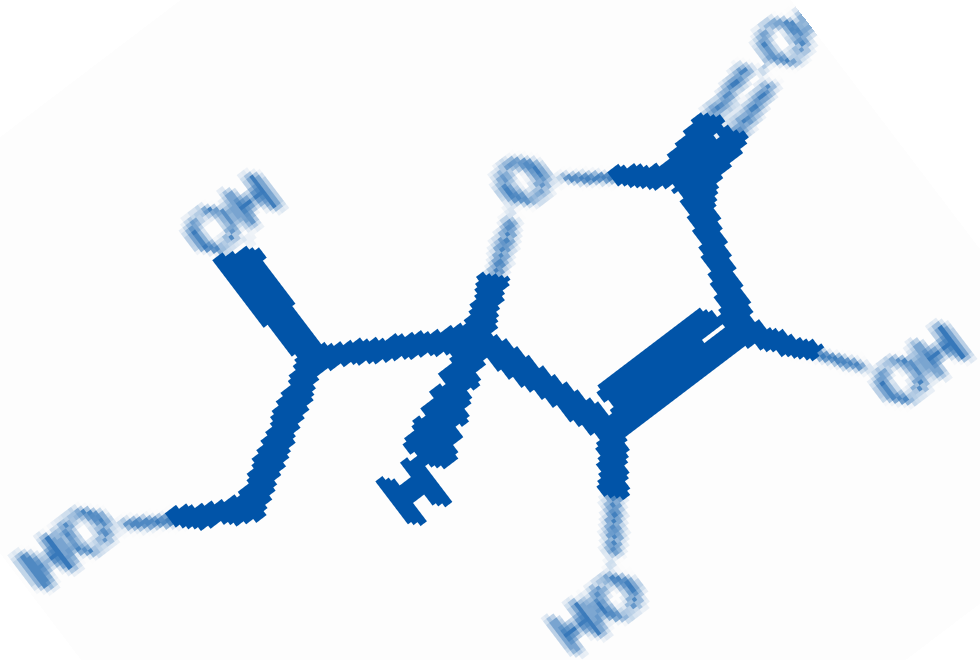
DE L'IMPORTANCE DU RECYCLAGE DE L'ASCORBATE DANS LA CROISSANCE ET L'ETABLISSEMENT DU RENDEMENT	57
Introduction	60
Matériels et méthodes	62
Résultats	67
Discussion	75
Conclusion	81
ANNEXE AU CHAPITRE 1	91

CHAPITRE 2

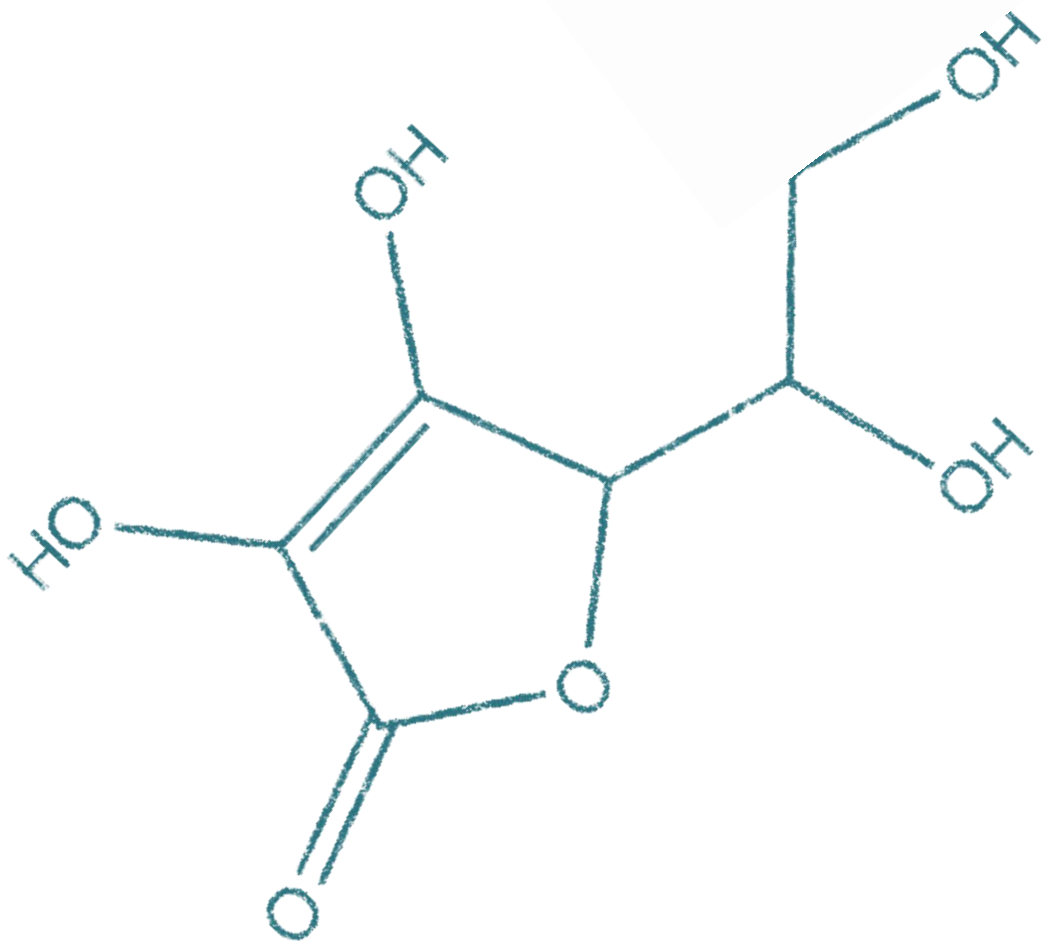
DU RÔLE DES ENZYMES MDHAR ET AO DANS LA CROISSANCE ET LE RENDEMENT CHEZ LA TOMATE CULTIVEE	101
Introduction	104
Matériels et méthodes	105
Résultats	107
Discussion	112
Conclusion	119
ANNEXE AUX CHAPITRES 1 ET 2	127
Travail préliminaire de mise au point de la détection et du dosage du radical MDHA	127
Transport des assimilats vers les fruits	133

CHAPITRE 3

DEGRADATION DE L'ASCORBATE	137
Introduction	140
Matériels et méthodes	143
Résultats	146
Discussion	153
Conclusion	157
DEGRADATION DE L'ASCORBATE DANS LE FRUIT	164
 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	 169
 BIBLIOGRAPHIE	 185
 ANNEXES	 203



Introduction



La tomate

Botanique

La tomate est originaire de la région des Andes en Amérique du Sud. Son centre de domestication reste à l'heure actuelle fortement débattu, et les hypothèses étudiées présentent deux origines probables ; une pré-domestication au Pérou complétée par une domestication complémentaire au Mexique (Blanca et al., 2015). Dès son introduction en Europe au 16^{ème} siècle, la tomate a été classée comme appartenant au genre *Solanum*. En 1753, Linné classe pour la première fois les tomates sous l'appellation *Solanum lycopersicum* mais ce nom fera l'objet de nombreux débats au cours de l'histoire, jusqu'à ce que des études moléculaires récentes valident son appartenance à la famille des Solanacées (Bergougnoux, 2014). La famille des Solanacées contient environ 3000 espèces parmi lesquelles, la belladone, la pomme de terre, le tabac, le poivron, l'aubergine et la tomate (soit de nombreuses espèces d'intérêt économique). Ce sont les Espagnols (le conquistador Cortès serait le premier) qui vont ramener des plants de tomate en Europe au XVI^e siècle durant leurs nombreux trajets maritimes depuis l'Amérique du Sud. A cette époque, la tomate est utilisée comme plante ornementale et médicinale et est connue sous le nom de pomme d'or (pomodori) ou pomme d'amour, appellation due à sa couleur jaune. Depuis l'Espagne, la tomate est introduite en Italie aux alentours de Naples (qui appartenait au royaume espagnol à cette époque). Le fruit n'est alors pas consommé car considéré comme toxique (le fruit de tomate sauvage est très riche en alcaloïdes). La culture de tomate à vocation alimentaire débute seulement au 18^{ème} siècle (même si une recette de gaspacho est retrouvée dans un livre de cuisine au début du 17^{ème} siècle). La sélection variétale, dans un premier temps empirique (variétés résistant le mieux aux pathogènes européens, taille des fruits, coloration, goût) puis via l'essor de la biotechnologie, a permis : la création de tomates aux formes, aux couleurs, aux goûts différents ; l'insertion de gènes de résistance à des pathogènes et à des circuits de commercialisation plus longs ; l'adaptation à des conditions climatiques et de cultures variées, etc. A travers cette évolution (domestication puis programme de sélection), la diversité génétique a fortement été réduite chez la tomate cultivée tout en conservant des caractères morphologiques variés (Bauchet et al., 2014).

La tomate est une plante diploïde ($2n=24$). Le plant de tomate présente une croissance sympodiale, chaque sympode étant composé de trois feuilles et d'un bouquet. C'est une plante herbacée qui peut présenter une croissance déterminée (l'apex se différencie en un bouton floral, caractère régit par le gène *sp*, pour self-pruning) ou indéterminée. La fleur de la tomate est actinomorphe et hermaphrodite. Elle est autogame.



Figure 1 : Photographie d'un fruit de tomate à maturité (photographie personnelle)



Figure 2 : Composition de la matière sèche d'un fruit de tomate. La matière sèche représente environ 5% de la masse totale du fruit. Elle est composée majoritairement de sucres (48% de la matière sèche totale, principalement sous forme fructose et glucose). Adaptée d'après Davies et al., 1981.

Les fruits sont de type « baie » (fruits charnus, épicarpe fin, mésocarpe et endocarpe charnus), de taille variant de quelques grammes à 2 kilogrammes (**Figure 1**).

Production

La production mondiale de tomate s'élevait à 161 millions de tonnes en 2012 (pour une surface de production estimée à 4,8 millions d'ha) (<http://faostat3.fao.org/home/E>). La Chine est le premier pays producteur de tomate dans le monde avec une production estimée à 50 millions de tonnes en 2012. La production de tomate en France en 2014 est chiffrée à 587 400 tonnes sur une surface de production de 2280 hectares (Agreste Conjoncture, infos rapides tomate, 2014) étalée principalement dans la région Sud-Est (31% de la production nationale) et la région Bretagne (36%), avec une part mineure de la production dans les Pays de la Loire (16%) et l'Aquitaine (9%). Les récoltes sont principalement réalisées sous serres, les cultures de plein champ restant minoritaires. L'hétérogénéité environnementale des zones de production implique différentes contraintes hydriques, salines et thermiques pour les producteurs.

Qualité nutritionnelle et organoleptique

Le fruit de la tomate est composé à 95% d'eau. Il présente un faible apport calorique (3% de glucides, 1% de protéines, traces de lipides). Il est communément admis que le rapport sucres/acides (acides principaux : acide malique et acide citrique ; sucres majoritaires : glucose, fructose) est un bon indicateur de la perception du goût de la tomate par le consommateur (Gautier et al., 2008). Les arômes, la texture et la jutosité sont également des critères qui entrent en jeu dans la perception de la qualité organoleptique. La tomate contient des fibres (**Figure 2**) et des minéraux (potassium, magnésium, calcium,...). La coloration rouge de la tomate est due à l'accumulation de caroténoïdes principalement le lycopène et le bêta-carotène (Davies et al., 1981). Ces caroténoïdes, fortement étudiés pour leurs propriétés anti-oxydantes (Bhowmik et al., 2012), semblent impliqués dans la protection contre certaines maladies dégénératives (cancer de la prostate, maladies cardiovasculaires). La tomate contient également d'autres molécules aux propriétés anti-oxydantes, telles que des flavonoïdes et des dérivés de l'acide hydroxycinnamique.

La consommation de tomates sous de nombreuses formes (frais, soupes, jus, concentré, etc.) augmente constamment depuis quelques années, associée avec la découverte des propriétés anti-oxydantes du lycopène et de ses dérivés. L'intérêt nutritionnel de la tomate sur la santé est également lié à la présence de provitamines A (précurseurs de la vitamine A) et d'une large diversité de vitamines du groupe B (B3, B5, B9). La tomate contient également de la vitamine C et représente un apport considérable de vitamine C pour notre organisme (Bhowmik et al., 2012).

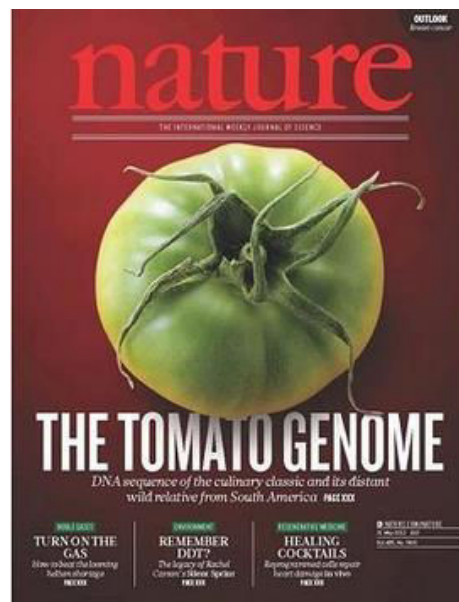


Figure 3 : Première page de couverture de la revue Nature datant du 30 mai 2012 présentant les résultats du génome entièrement séquencé de la tomate cultivée.

Le monde de la recherche et la tomate

Dans le domaine de la recherche en biologie végétale, qu'elle soit fondamentale ou appliquée, la tomate est utilisée comme espèce modèle. Elle diffère d'autres espèces modèles telles qu'*Arabidopsis thaliana*, le maïs, le riz et le peuplier par une distance phylogénétique importante mais aussi pour la production de fruits charnus consommés par l'homme. La possibilité de faire croître des plants de tomates dans de multiples conditions environnementales permet d'étudier sa tolérance aux stress abiotiques (et les réponses associées). De plus, la culture de tomate représente un fort intérêt économique et son amélioration constante est essentielle pour la filière (de la sélection génétique à l'assiette du consommateur, en passant par l'amélioration des itinéraires techniques).

Dans cet optique, de nombreux outils sont à la disposition de la recherche, le génome de la tomate étant entièrement séquencé depuis 2012 (Consortium, 2012) à la suite d'un travail communautaire d'une durée de presque 10 ans regroupant 300 chercheurs de 14 pays (**Figure 3**) ; l'ordre, les types et positions des 35000 gènes y sont recensés. Les données sont en libre accès sur le site <http://solgenomics.net/>. En plus de l'existence de 25 000 variétés de tomate en collection dans le monde, une très large diversité de mutants est aussi disponible et permet aux scientifiques d'isoler et d'étudier des gènes clés du développement et de la croissance de la plante.

En effet, la transformation de la tomate par *Agrobacterium tumefaciens* est connue depuis 1986 (McCormick et al., 1986). L'introduction de gènes pouvant apporter des bénéfices agronomiques dans la tomate est commun (augmentation de la taille du fruit (gène cible *fw2.2* ; (Cong et Tanksley, 2006), teneur en sucres solubles (gène cible *Lin5* ; (Zanor et al., 2009), résistance aux stress salins (gène cible *GlyI* et *GlyII* ; (Viveros et al., 2013),...) et lui confère un statut de plante modèle des plantes cultivées dicotylédones. La possibilité de cultiver des tomates dans diverses conditions de culture, la relative faible durée du cycle de vie, la capacité de production des graines, la taille assez faible du génome (950Mb), le contrôle de la pollinisation et de l'hybridation, la possibilité d'effectuer une propagation asexuée via le greffage et celle de régénérer des plantes entières à partir de différents explants ; l'ensemble de ces caractères en font une excellente plante pour la recherche (Gerszberg et al., 2014).

Ascorbate

Histoire anthropocentrée de l'ascorbate

Au beau milieu du 18^{ème} siècle, de nombreuses expéditions maritimes ont lieu tout autour du globe. Les équipages des navires passent plusieurs semaines en mer sans approvisionnements provenant de la terre. Les marins sont alors frappés d'étranges symptômes, notamment des dégénérescences dentaires et des hémorragies pouvant entraîner la mort, et mettant en péril les expéditions. Cette maladie est appelée scorbut. De manière empirique, les capitaines des bateaux observent que l'ingestion d'agrumes par les marins permet de prévenir voir même de guérir du scorbut. Le docteur James Lind, médecin de la marine britannique, embarque alors sur un navire afin d'y mener une expérience. Il pense alors que l'acidité contenue dans les agrumes est responsable de la diminution des symptômes de dépérissement du corps humain. Dans l'objectif de tester son hypothèse, il divise en deux groupes l'effectif déjà malade présent sur le navire. Le premier groupe se voit administré une dose d'un mélange acide contenant, entre autres, de l'acide sulfurique et du vinaigre. Il fournit au second groupe de marins malades des oranges et des citrons.

Il remarque alors que le second groupe présente une amélioration de son état sanitaire. La plupart de ces marins guérissent, tandis que ceux du premier groupe ne survivent pas. Le docteur Lind conclut alors que les agrumes possèdent une molécule qui prévient des dangers du scorbut. Inconnue à cet instant de l'histoire, il faut attendre près de 200 ans plus tard, en 1930, pour que les docteurs Szent-Gyorgyi et Haworth isolent cette molécule sur du poivron et l'identifie (Szent-Györgyi and Haworth, 1933). Dans un premier temps affublée de noms évocateurs de l'ignorance de sa nature et de sa fonction (« Ignose » ou « Godnose » (pour « God knows »)), elle est nommée bien plus tard acide ascorbique en raison de sa nature (acide) et de sa fonction (anti-scorbut). Elle rapporte un prix Nobel aux deux chercheurs en 1937 (Moss, 1988).

L'homme a perdu la faculté de synthétiser l'ascorbate durant l'évolution (comme certains oiseaux, les primates et le cochon d'inde). C'est la perte de fonctionnalité de l'enzyme catalysant la dernière étape de synthèse de l'ascorbate chez les animaux, la gulono-1,4 γ -lactone oxydase (GuLO), qui a entraîné ce phénomène (Lachapelle and Drouin, 2010; Nishikimi et al., 1994, 1992). Cette étape provoquait également la formation du peroxyde d'hydrogène ou H_2O_2 . Cette molécule est un puissant oxydant. La perte de cette faculté à synthétiser l'ascorbate pourrait avoir donné un avantage évolutif à ces animaux mangeurs de fruits en améliorant le contrôle redox (Wheeler et al., 2015).

De nos jours, et alors que les cas de scorbut sont devenus anecdotiques, les fruits et légumes (dont la tomate, deuxième « légume » le plus consommé au monde) sont notre principale source d'acide ascorbique (70% de nos besoins). La vitamine C est reconnue pour sa forte activité antioxydante, apportant une protection bienvenue contre les maladies liées au stress oxydatif telles que certains cancers, des maladies cardiovasculaires, le vieillissement...(Diplock, 1998). De très récentes études (Chao et al., 2015; Esteban and Pei, 2012; Young et al., 2015) mettent en avant le rôle de l'ascorbate en tant que cofacteur essentiel dans la dé-méthylation de l'ADN (cofacteur des dioxygénases) et des histones (cofacteur des histones déméthylases). Ces enzymes, dites épigénétiques, contribuent à des changements phénotypiques pouvant aboutir à l'apparition de maladies génétiques : elles sont donc considérées comme marqueurs épigénétiques reconnus. Les scientifiques suggèrent une prise de 200mg/jour dans le but de profiter des bénéfices potentiels sur la santé de la vitamine C (Frei et al., 2012). Cet apport d'ascorbate recommandé par jour chez les femmes enceintes pourrait être réévalué notamment au stade précoce de grossesse, où son rôle en tant que cofacteur pourrait être le plus important. Par ailleurs, une activité pro-oxydante de la vitamine C peut également apparaître à des doses de 500mg/jour (Podmore et al., 1998), tandis que des effets défavorables d'une sur-ingestion de vitamine C (diarrhée) peuvent avoir lieu avec une dose de 2000mg/jour (Schlueter and Johnston, 2011).

Chimie

La vitamine C, ou acide ascorbique, ou L-ascorbate, est référencé dans la suite de ce document sous l'appellation ascorbate. L'ascorbate est un acide organique hydrosoluble de petite taille, de formule $C_6H_8O_6$, proche de celle des sucres (dont elle dérive) et de poids moléculaire 176,13 g/mol. Son nom provient de son action anti-scorbut. L'ascorbate possède des propriétés antioxydantes reconnues au travers de l'action de sa forme ascorbate réduite nommé AsA. Elle est oxydée en monodéhydroascorbate (MDHA), molécule instable et qui se dissocie rapidement en déhydroascorbate (DHA), molécule oxydée mais stable et présentant peu de danger pour les cellules. Cette oxydation peut être non-enzymatique (via l'interaction avec les espèces réactives de l'oxygène ROS notamment) ou enzymatique via l'action de l'ascorbate peroxydase (APX) ou de l'ascorbate oxidase (AO). *In vivo*, le MDHA se forme lors de la perte d'un électron par la molécule d'ascorbate et peut être recyclé en AsA par l'enzyme monodéhydroascorbate reductase (MDHAR), tandis que le DHA correspond à la perte supplémentaire d'un électron par le MDHA (soit l'ascorbate moins deux électrons). Par la suite, le DHA est ensuite soit réduit en AsA par l'enzyme déhydroascorbate reductase (DHAR) soit dégradé. L'ensemble de ces formes, AsA, MDHA et DHA forme le pool d'ascorbate (**Figure 4**).

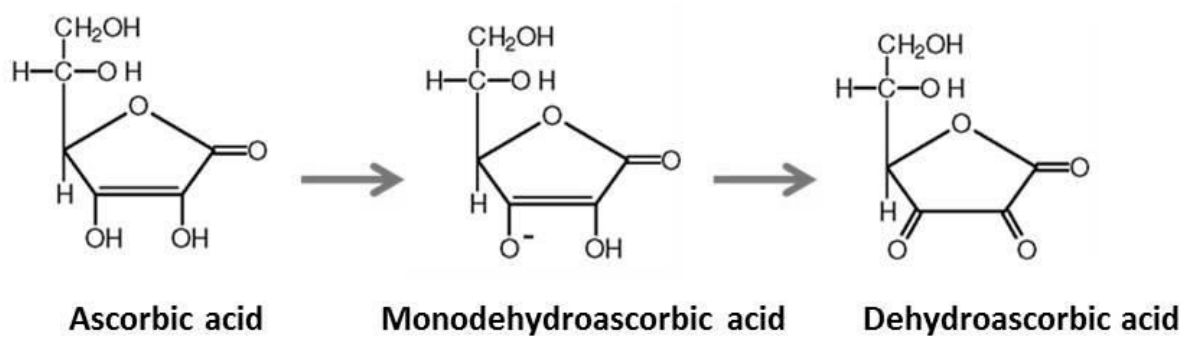


Figure 4 : Représentation chimique des molécules d'ascorbate réduite et oxydée (déhydroascorbate) ainsi que du radical monodéhydroascorbate. L'ensemble de ces molécules forme le pool d'ascorbate. D'après (Szent-Györgyi and Haworth, 1933)

Une fois ingérée, l'ascorbate peut être dégradé dans l'organisme. Chez l'homme, la dégradation de la vitamine C *in-vivo* est assez peu renseignée et ces connaissances sont résumées en **Figure 5**. Les produits possibles et identifiés *in-vitro* sont le diketogulonate (DKG), L-érythrulose, l'oxalate, L-xylosone, L-lyxonate, L-thréosone et 3-deoxythréosone. La voie principale de dégradation en conditions non oxydantes mène à la formation d'oxalate et L-érythrulose à partir du 2,3-diketogulonate (DKG) (Nemet and Monnier, 2011), tandis qu'en conditions fortement oxydantes (en présence d'H₂O₂), le thréonate est le produit principal (Linster et Van Schaftingen, 2007; Simpson and Ortwerth, 2000). Récemment, diverses études (sur les mammifères) ont analysé les réactions entre des produits contenant des aldéhydes issus de la dégradation du DHA et les groupements aminés de peptides ou protéines (Kay et al., 2013). Certains de ces composés de dégradation peuvent ainsi réagir avec la lysine, l'arginine voire même le résidu cystéine du GSH (Regulus et al., 2010), à travers une réaction de type Maillard, et provoquer des alkylations de protéines. Cette modification (observation *in-vitro*) peut intervenir de manière assez rapide (heures), alors que, habituellement, la réaction classique des sucres avec les protéines nécessite une durée plus longue (mois). Les produits ainsi formés sont appelés AGE (pour advanced glycation end-products) et sont suspectés d'avoir un impact dans de nombreuses dégénérescences chez l'homme (vieillesse, cataracte, diabète (Goh and Cooper, 2008; Singh et al., 2001). Ces réactions ne sont pas observées *in-vivo* et cette différence serait due à l'activité de recyclage de l'ascorbate (au niveau des érythrocytes avec le glutathion comme cofacteur), ce qui fait de l'ascorbate un anti-glycateur lorsque le recyclage est possible, et un pro-glycateur lorsque l'activité de recyclage est impossible (Sadowska-Bartosch and Bartosz, 2015).

Par ailleurs, l'ascorbate est utilisé par l'homme dans les processus de conservation de boissons et autres produits alimentaires mais également dans des produits cosmétiques, des compléments alimentaires. Cependant, les coûts financiers et écologiques liés à la synthèse industrielle d'acide ascorbique sont particulièrement élevés et motivent de nouvelles recherches visant à comprendre les mécanismes responsables de son accumulation dans les plantes.

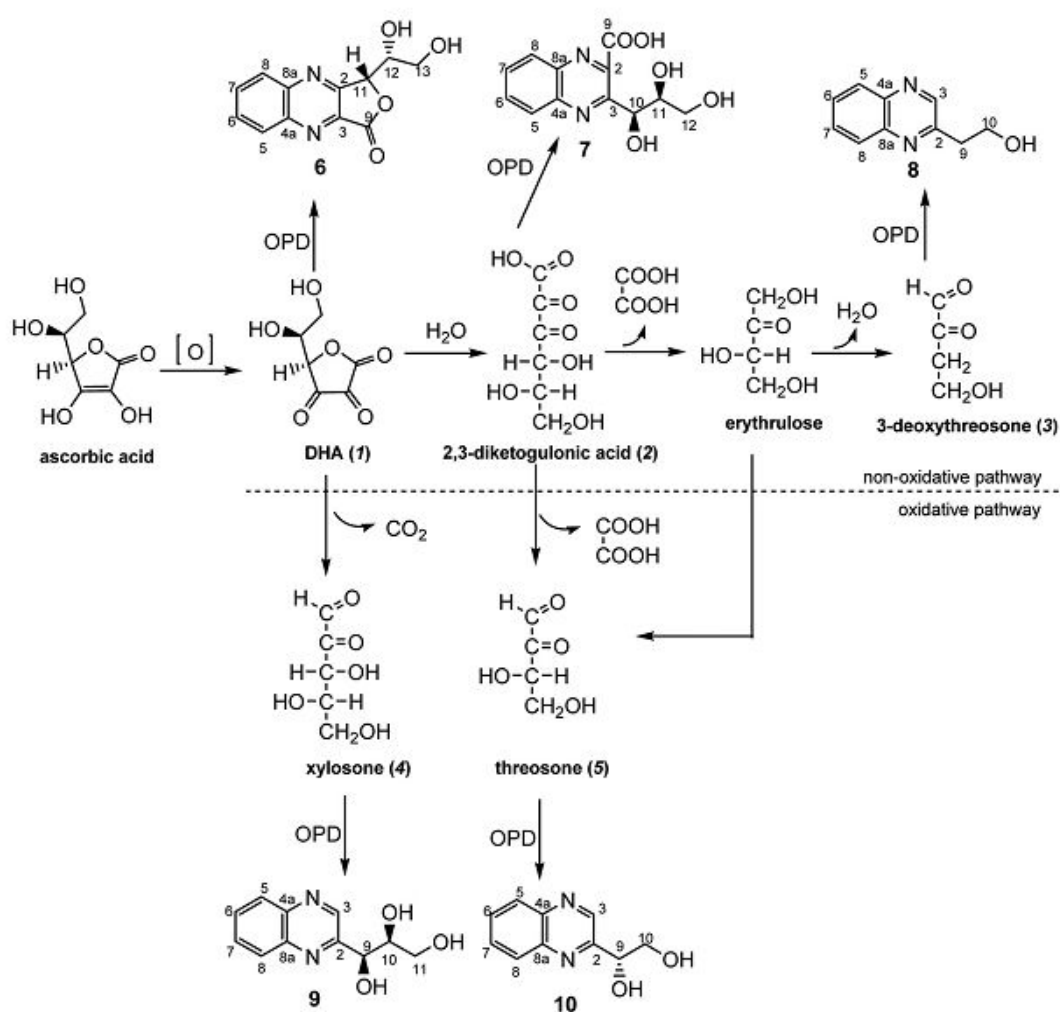


Figure 5 : Dégradation du déhydroascorbate pouvant se dérouler en conditions oxydantes et non oxydantes et les produits d'accumulation possibles étudiés *in vitro* chez l'homme. 6-10 = quinoxalines provenant de la dérivatization. D'après (Nemet and Monnier, 2011).

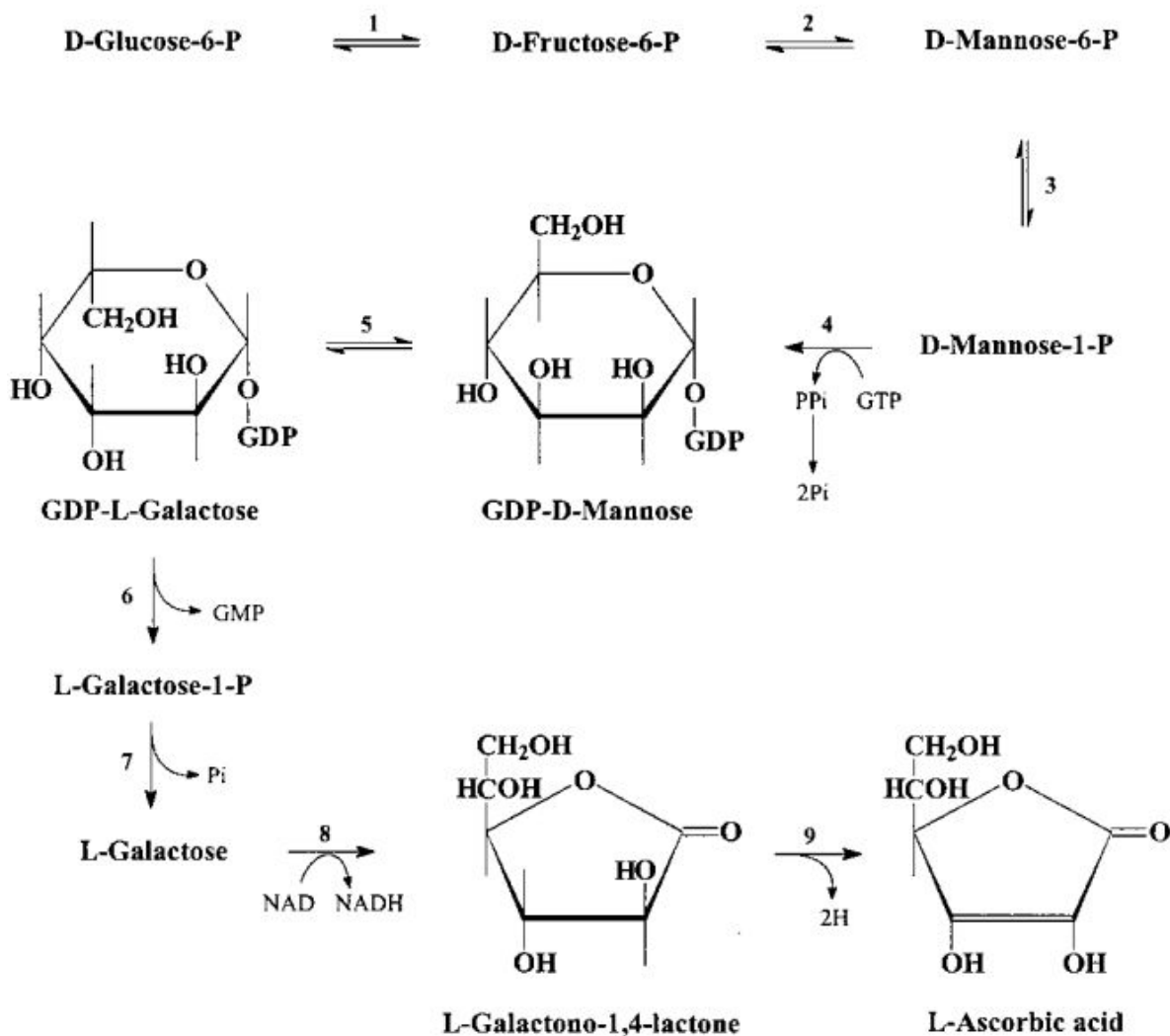


Figure 6 : Voie principale de biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes (voie GDP-Mannose/L-Galactose). Identification des enzymes : 1- Phosphoglucose isomerase 2- Phosphomannose isomerase 3- Phosphomannose mutase 4- GDP-Mannose pyrophosphorylase (**GMP**) 5- GDP-D-Mannose-3,5 epimerase (**GME**) 6- GDP-L-Galactose pyrophosphatase (**GGP**) 7- L-Galactose-1-phosphate phosphatase 8- L-Galactose dehydrogenase 9- L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase. D'après (Wheeler et al., 1998).

Les plantes et l'ascorbate

Synthèse de l'ascorbate chez les plantes

La voie de biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes est restée assez inconnue jusqu'à une période relativement récente (Wheeler et al., 1998). Des observations antérieures confirmaient la conversion d'hexoses en ascorbate (Loewus, 1963; Loewus et al., 1987) chez les plantes comme chez les animaux, avec une inversion du C1 du glucose en C6 de l'ascorbate uniquement chez les animaux. Smirnoff et Wheeler sont les premiers à élucider la voie GDP-Mannose/L-Galactose (voie Man/Gal) chez les plantes et à identifier le L-galactono-1,4-lactone comme dernier précurseur de l'ascorbate (**Figure 6**). Les trois étapes clés sont alors décrites : oxydation du C1 suivi de la formation du groupement 1,4-lactone ; oxydation en C2 et C3 pour former le groupe *enediol* ; enfin une épimérisation en C5 pour passer de la configuration D à la L (Loewus et al., 1987; Smirnoff and Wheeler, 2000). Chez les plantes, c'est donc l'enzyme L-galactose déshydrogénase (GaLDH) qui catalyse la dernière étape de biosynthèse et, au contraire des animaux (enzyme gulono-1,4-γ-lactone oxydase), aucune production d'H₂O₂ n'est observée.

Chez les plantes, toutes les cellules peuvent synthétiser de l'ascorbate. La quasi-totalité de la biosynthèse se déroule dans le cytosol. La dernière étape nécessitant la L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase ne peut se dérouler que dans la membrane interne de la mitochondrie où 80% de l'activité de l'enzyme est observé (Bartoli et al., 2000). L'ascorbate ainsi produit peut facilement être transporté à travers la membrane externe et être distribué aux autres organelles (cf. partie transport). Il existe également un fort rétrocontrôle de l'activité de la voie de biosynthèse par la concentration en ascorbate. Ce rétrocontrôle s'exerce essentiellement sur l'activité des gènes de sa biosynthèse (Mieda et al., 2004; Wolucka and Montagu, 2003). Cette régulation serait post-transcriptionnelle et agirait sur la concentration de l'enzyme GGP (Laing et al., 2015), mettant en jeu, uniquement lorsque la concentration en ascorbate est élevée, une séquence codante (un *uORF* pour upstream open reading frame) réprimant la séquence en aval codant pour la GGP. La perturbation de cette séquence en amont stoppe le rétrocontrôle par la concentration en ascorbate précédemment décrit. Le contrôle de cet *uORF* permettrait ainsi d'augmenter la teneur en ascorbate dans les feuilles (comme cela a été observé chez *Arabidopsis* par Laing et al. 2015).

Le contrôle de cette étape catalysée par la GGP (**Figure 6**) se révèle être le point de régulation central de la teneur en ascorbate. Une surexpression de cette enzyme entraîne une augmentation substantielle de la concentration en ascorbate, alors que la surexpression des autres enzymes de la voie de biosynthèse n'a pas d'effet sur la teneur en ascorbate (Bulley et al., 2012).

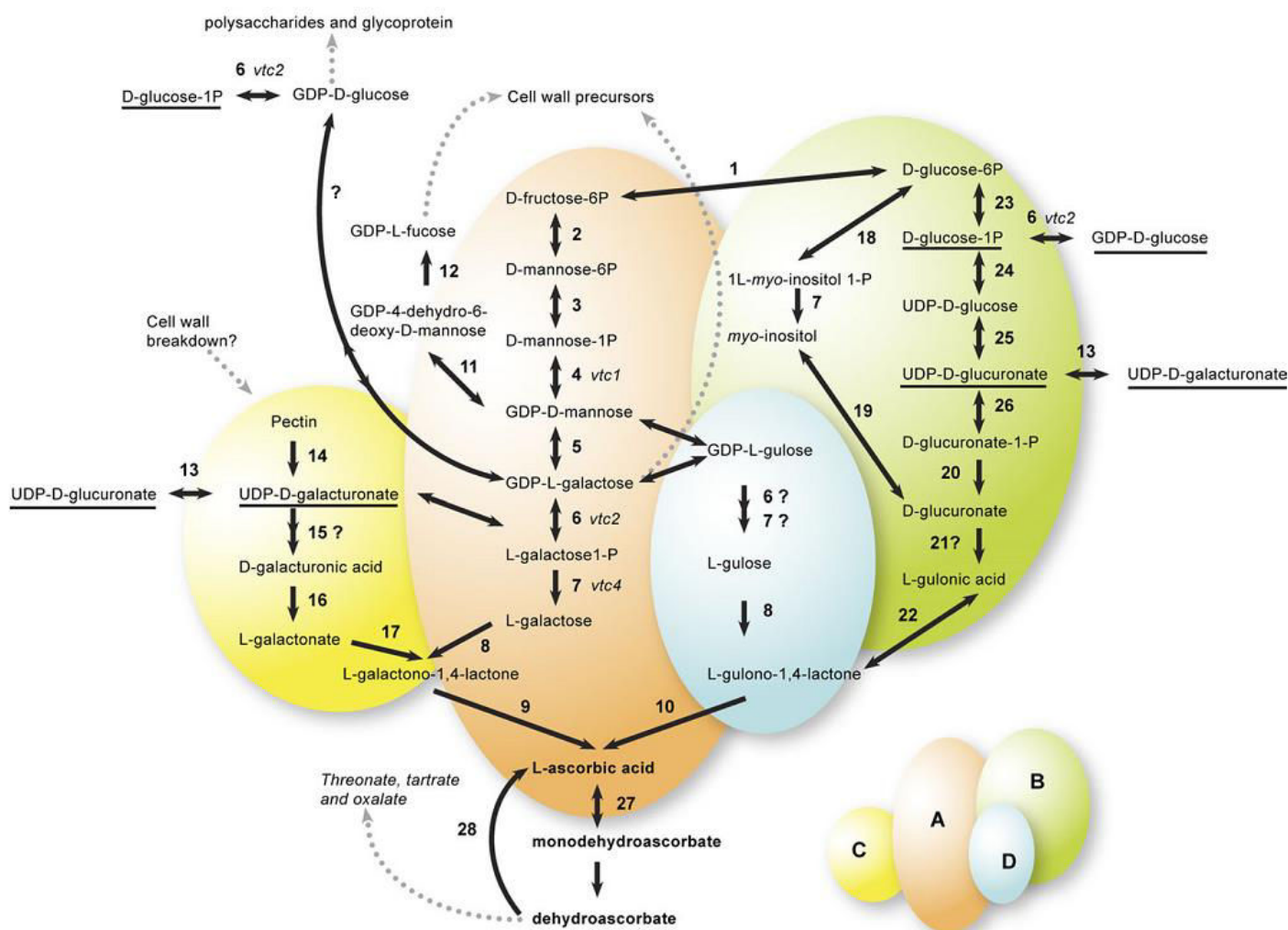


Figure 7: Reactions, enzymes, and context of ascorbic acid biosynthesis and regeneration in plants.

(A) L-Galactose pathway (Man/Gal), reactions 2–9.

(B) myo-Inositol/glucuronate pathway, reactions 7, 18–26.

(C) Galacturonate pathway, reactions 14–17.

(D) L-Gulose pathway, possible reactions 5, 6, 7, 8, and 10.

Reactions with question marks after the number are hypothetical and the exact enzyme is yet to be identified. Underlined chemical names are those that appear in more than one position in the diagram. **1**, glucose-6-phosphate isomerase; **2**, mannose-6-phosphate isomerase; **3**, phosphomannomutase; **4**, GDP-mannose pyrophosphorylase (**GMP**); **5**, GDP-mannose-3,5-epimerase (**GME**); **6**, GDP-L-galactose transferase (**GGP**); **7**, L-galactose-1-phosphate phosphatase; **8**, L-galactose dehydrogenase; **9**, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase; **10**, L-gulono-1,4-lactone oxidase; **11**, GDP-D-mannose-4,6-dehydratase; **12**, GDP-L-fucose synthase; **13**, UDP-galacturonate epimerase; **14**, polygalacturonate 4- α -galacturonosyltransferase; **15**, galacturonate-1-phosphate uridylyltransferase and galacturonate-1-phosphate phosphatase (hypothetical); **16**, D-galacturonic acid reductase; **17**, aldolactonase; **18**, L-myo-inositol 1-phosphate synthase; **19**, myoinositol oxygenase; **20**, D-glucurono-1-phosphate phosphatase; **21**, glucuronate reductase; **22**, gulonolactonase; **23**, phosphoglucomutase; **24**, UDP-glucose-pyrophosphorylase; **25**, UDP-glucose dehydrogenase; **26**, glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase; **27**, monodehydroascorbate reductase; **28**, dehydroascorbate reductase. D'après Bulley, 2009.

De plus, les protéines associées à la GGP ont été observées dans le noyau, suggérant un rôle de régulation de la transcription (en plus de leur rôle enzymatique ; Müller-Moulé, 2008). L'ensemble des observations est confirmé par l'analyse de mutants *vtc2* et *vtc5* (appellation des gènes codant pour la GGP), mutation par ailleurs létale chez les jeunes plants d'*Arabidopsis* (Dowdle et al., 2007) sans apport d'ascorbate ou de galactose exogène. L'expression des gènes *vtc2* et *vtc5* serait influencée par l'intensité lumineuse et le rythme circadien. Le gène *vtc2* joue un rôle majoritaire avec une expression de 100 à 1000 fois supérieure à celle de *vtc5* (Linster et al., 2007), mais *vtc5* pourrait compenser la perte d'expression de *vtc2* au stade précoce de germination (Gao et al., 2011) tandis que les promoteurs associés à *vtc2* et *vtc5* pourraient être impliqués dans l'activation par la lumière de la voie de biosynthèse. Ces résultats mis bout à bout nous indiquent clairement le rôle essentiel de cette étape de la voie de biosynthèse dans la régulation de la teneur en ascorbate. Il semblerait cependant que la GME (première réaction spécifique de la voie) représente une autre enzyme clé de régulation, comme démontré chez la tomate où une sous-expression aboutit à une diminution de la teneur dans les feuilles et les fruits (Gilbert et al., 2009). Il a été démontré chez le kiwi que la GME et la GGP agissaient de manière synergique, révélant une corrélation entre le niveau de transcrits de ces enzymes et la teneur en ascorbate (Bulley et al., 2009). Les mutants GMP (*vtc1*) et L-galactose-1P-phosphatase présentent également une corrélation entre l'activité de l'enzyme précité et la concentration en ascorbate, mais ne représenteraient pas un point de contrôle essentiel de la voie (Conklin et al., 2000; Veljovic-Jovanovic et al., 2001) comme peuvent l'être les étapes catalysées par GGP et GME.

Il a rapidement été évoqué la possible existence de voies alternatives de synthèse de l'ascorbate (**Figure 7**) chez les plantes (Hancock and Viola, 2005; Valpuesta and Botella, 2004) à la suite de l'observation de nombreux mutants déficients en certains gènes de la voie principale de biosynthèse chez *Arabidopsis* (Conklin, 2001) mais également sur d'autres espèces comme la tomate (Cronje et al., 2012) ou la fraise (Cruz-Rus et al., 2011). Il n'y a guère de doute que la voie Man/Gal soit la voie prééminente de synthèse de l'ascorbate chez les plantes (et *a fortiori* chez la tomate (Ioannidi et al., 2009). Cependant, elle n'implique pas moins de 9 enzymes pour transformer le G6P en ascorbate (sachant également qu'elle contient des précurseurs clés pour la synthèse des parois cellulaires...). Récemment, la voie *myo*-inositol chez les plantes et ses (uniquement) 6 enzymes requises ont attiré l'attention de la recherche (Valluru and Van den Ende, 2011; Xiang et al., 2011). Découverte par Lorence et al. (2004) sur *Arabidopsis thaliana*, elle implique l'enzyme *myo*-inositol oxydase (miox) et aboutit au gulono-1,4-lactone comme dernier précurseur de l'ascorbate.

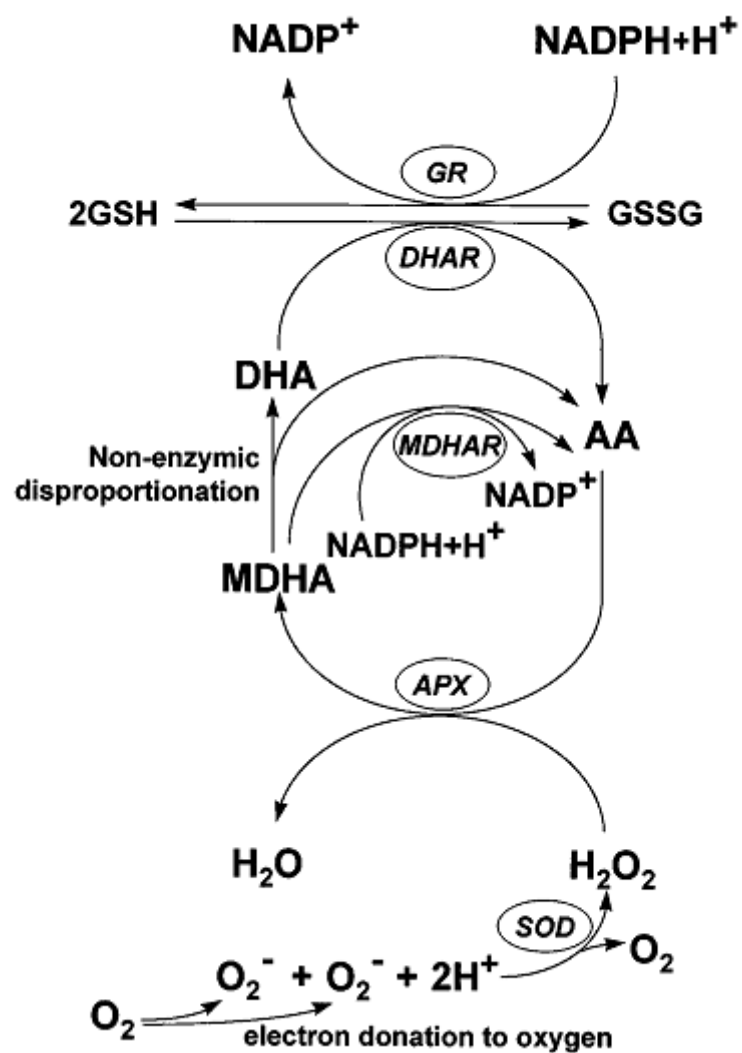


Figure 8 : Cycle ascorbate-glutathion permettant le recyclage de l'ascorbate oxydé en ascorbate réduit. D'après (Noctor et Foyer, 1998).

Elle emploie un composé intermédiaire (D-glucuronate) également présent dans la voie de biosynthèse décrite chez les animaux. En conditions de stress métabolique (manque de sucres), la plante est capable de maintenir un certain niveau d'ascorbate dans ses cellules malgré une diminution du stock de carbone (Li et al., 2010), et une augmentation de l'activité de la voie *myo*-inositol pourrait être impliquée (Xiang et al., 2011). L'existence de cette voie demeure hypothétique chez la tomate et remise en cause (Endres and Tenhaken, 2009) malgré de fortes avancées dans la reconnaissance des mécanismes de son expression. Par ailleurs, Wolucka et Van Montagu suggèrent l'existence de la voie dite L-gulose (voie Gul). Cette voie dérive de la voie principale Man/Gal à partir du GDP-D-Man (étape 6) et partage le gulono-1,4-lactone comme dernier précurseur de l'ascorbate avec la voie *myo*-inositol (Wolucka and Montagu, 2003). Une autre possibilité de biosynthèse de l'ascorbate provient des parois cellulaires. En effet, la dégradation des polysaccharides pariétaux fournirait des précurseurs à l'ascorbate. Chez la fraise, l'accumulation d'ascorbate se produit durant la maturation du fruit via le galacturonate (Agius et al., 2003). Il a été noté une corrélation entre ramollissement de la fraise, augmentation de l'activité du gène codant pour une galacturonate reductase et accumulation d'ascorbate. Cette observation a été confirmée sur tomate (Badejo et al., 2012).

Oxydation de l'ascorbate

L'oxydation de l'ascorbate est au cœur de la défense antioxydante. Elle peut apparaître de façon non enzymatique, l'ascorbate interagissant directement avec un radical, ou enzymatique via l'ascorbate peroxydase (APX) ou l'ascorbate oxydase (AO). L'APX permet la détoxification de l' H_2O_2 en le transformant en H_2O grâce à l'utilisation de l'ascorbate réduit comme cofacteur (il cède ces électrons). De son côté, l'AO oxyde l'ascorbate réduit (consommation d'un demi O_2 pour former une molécule d' H_2O) dans le compartiment apoplastique.

Recyclage de l'ascorbate

Une fois oxydée en MDHA (perte d'un électron) puis en DHA (perte d'un électron supplémentaire), le processus de recyclage (Noctor et Foyer, 1998) peut se mettre en marche (**Figure 8**). La forme MDHA peut être réduite en AsA via l'enzyme MDHAR (utilisant NADPH (qui cède un électron) comme cofacteur préférentiel). La forme DHA peut être réduite en AsA via la DHAR (utilisant le glutathion comme donneur d'électrons). Cette capacité de recyclage est essentielle pour la défense antioxydante, puisqu'elle régit l'état redox de la cellule (l'ascorbate étant présent en grande quantité dans la plante). Chez les plantes supérieures, le taux de recyclage est estimé en moyenne à 13% par heure (Pallanca et Smirnoff, 2000).

Ce taux de recyclage pourrait être dépendant du stade du fruit (recyclage relativement faible dans les jeunes fruits en croissance) et corrélé positivement à l'activité de synthèse de l'ascorbate comme observé chez le cassis (Hancock et al., 2007). Chez la fraise, il semblerait que l'activité MDHAR augmente de manière corrélée (x17) au cours de la maturation du fruit tandis que DHAR a son activité la plus forte lorsque le fruit est vert (Cruz-Rus et al., 2011). Dans des fruits d'acérola, très riche en ascorbate, l'activité de l'enzyme DHAR est la plus forte dans les fruits verts en maturation (stade intermédiaire de leur maturation). L'activité de l'enzyme MDHAR est quant à elle uniquement détectée dans des fruits sur-matures (Eltelib et al., 2011). La teneur en ascorbate étant la plus forte en fin de maturation dans les fruits d'acerola, il est possible que MDHAR ait une activité reliée au pool d'ascorbate et puisse participer au maintien de ce dernier dans les fruits mûrs. Dans les fruits verts, il semblerait que DHAR soit l'enzyme de recyclage la plus active, ce qui est en accord avec les résultats observés sur tomate (Ioannidi et al., 2009; Tsaniklidis et al., 2014b) et kiwi (Bulley et al., 2009). L'activité de DHAR serait par ailleurs 4 fois supérieure à celle de MDHAR dans les feuilles de tomates conduites en conditions optimales de croissance (Ioannidi et al., 2009). L'activité MDHAR augmenterait lorsque la plante est soumise à des conditions stressantes (faibles ou fortes températures, herbivorie, hypoxie).

L'importance du recyclage de l'ascorbate sur les fonctions de croissance et la réponse aux changements de l'environnement est finement résumée par Gallie (Gallie, 2013a). L'augmentation du recyclage par voies génétiques a fait l'objet de nombreuses recherches. L'augmentation de l'activité de la voie de synthèse ne pouvant se réaliser dans des temps très courts (Bartoli et al., 2006), la capacité du système de recyclage de l'ascorbate à réagir rapidement à des changements de l'environnement (stress) en fait un levier d'amélioration intéressant. Une augmentation de l'expression de l'enzyme DHAR (Chen et al., 2003) entraîne une augmentation de la teneur en ascorbate réduit (rapport réduit sur oxydé augmente) et du glutathion réduit (GSH), ce qui implique donc des changements importants de l'état redox de la cellule. La voie de biosynthèse n'est pas affectée, ce qui confirme l'importance du recyclage dans cette augmentation. Les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'expression de DHAR ait été perçue comme un stress par la plante, ce qui aurait entraîné l'accumulation du GSH (pourtant cofacteur de la DHAR). Des résultats similaires ont été observés sur *Arabidopsis* (Wang et al., 2010) et pomme de terre (Qin et al., 2011) avec un lien direct entre surexpression de la DHAR et augmentation de l'AsA (par contre, pas d'augmentation du GSH). La défense antioxydante est également améliorée.

Sur tomate (Haroldsen et al., 2011), la surexpression de DHAR n'entraîne pas de modification de la teneur en AsA en conditions de croissance classiques, mettant ainsi en évidence le fort rétrocontrôle du pool d'ascorbate sur la voie de synthèse (Pallanca et Smirnoff, 2000).

Les résultats d'une surexpression de l'enzyme MDHAR sont, à l'inverse, assez contradictoires. Des études sur le tabac ont mis en évidence le rôle de MDHAR dans la tolérance à l'ozone et au stress salin (Eltayeb et al., 2007). Les auteurs observent alors une augmentation de la teneur en ascorbate de leurs plantes sur-exprimant la MDHAR. A l'inverse, d'autres études évoquent plutôt une corrélation négative entre l'expression du gène MDHAR et la teneur en ascorbate (Gest et al., 2013a; Haroldsen et al., 2011; Ren et al., 2014; Stevens et al., 2008). Ce phénomène n'est pas clairement intégré mais concernerait uniquement l'isoforme (MDHAR3) cytosolique et péroxysomale de l'enzyme. La voie de biosynthèse n'agit pas comme un compensateur de la perte d'activité de l'enzyme (Gest et al., 2013a), tandis que les activités des autres enzymes (DHAR, GR, AO, APX) impliquées dans le cycle ascorbate-glutathion sont plus (Ren et al., 2014) ou moins (Gest et al., 2013a) modifiées et ne peuvent, dans tous les cas, pas expliquer le phénotype ascorbate observé. L'activité MDHAR est par ailleurs corrélée avec une tolérance accrue au chilling (perte de fermeté moins importante) en post-récolte (Stevens et al., 2008; Tsaniklidis et al., 2014a), peut être due à une augmentation du pool de glutathion (Airaj et al., 2013), ce qui placerait MDHAR au cœur de l'interface ascorbate-glutathion. En effet, MDHAR pourrait également agir comme protecteur du pool de glutathion, en limitant l'utilisation de la DHAR dans le recyclage de l'ascorbate (**Figure 8**).

Le coût énergétique d'un recyclage de l'ascorbate par la DHAR engendre la consommation de glutathion. La synthèse du glutathion a un coût élevé pour la cellule puisqu'il nécessite la consommation d'ATP lors de ses deux étapes de synthèse. Le recyclage de MDHA par la MDHAR permettrait de limiter cette consommation de glutathion. Chez les plantes « supérieures », MDHAR fait partie d'une famille multigénique (Gest et al., 2013b). On retrouve 5 loci correspondant au gène MDHAR chez *Arabidopsis* aboutissant à la formation de 6 isoformes localisées dans les chloroplastes, les mitochondries, deux isoformes dans les péroxysomes et enfin deux isoformes cytosoliques (Lisenbee et al., 2005; Obara et al., 2002). Chez la tomate, 3 isoformes de l'enzyme MDHAR sont recensées et localisées dans les chloroplastes, le cytosol et les péroxysomes (Gest et al., 2013b; Stevens et al., 2007). Les conditions d'oxydation dans les plantes sont très souvent des oxydations mono-électroniques et la localisation de MDHAR dans de multiples compartiments permettrait de recycler le monodéhydroascorbate avant qu'il ne soit disproportionné en déhydroascorbate (protégeant dans le même temps le pool de glutathion).

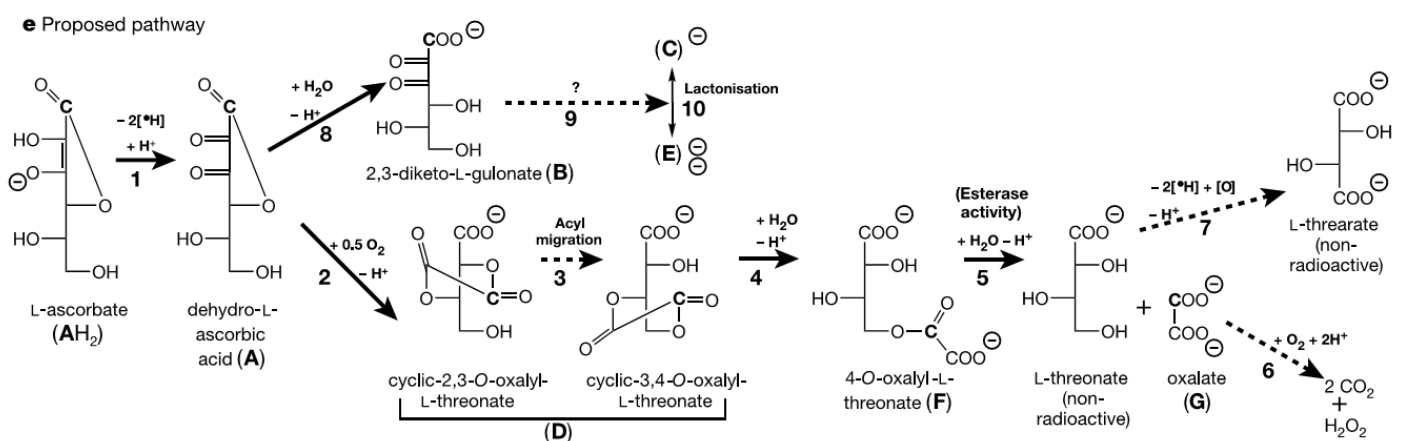


Figure 9 : Voie de dégradation de l'ascorbate dans l'apoplasme du Rosier, proposée par Green et Fry, 2005. Excepté les étapes 6 et 7, toutes les réactions peuvent se dérouler de manière non enzymatique, certaines sont cependant accélérées par des enzymes. C et E = carboxypentonates
D'après (Green et Fry, 2005).

Dégradation de l'ascorbate

En conditions *in-vitro* à pH neutre, les produits de dégradation majoritaires de l'ascorbate à partir de l'hydrolyse de sa forme oxydée (DHA) en 2,3-diketogulonate (DKG) sont l'érythrose (28.3%), l'oxalate (59.8%) et le thréonate (24.9%) (Smuda and Glomb, 2013). Ces produits sont obtenus suite à une fragmentation β -dicarbonyl et une oxydation α -dicarbonyl du DKG.

Les mécanismes *in vivo* entraînant la dégradation de l'ascorbate chez les plantes ne sont pas bien connus. L'ascorbate s'oxyde très rapidement et 40% du pool d'ascorbate peut être perdu (dégradé) en 24h dans les feuilles d'*Arabidopsis* détachées et maintenues à l'obscurité (Conklin et al., 1997). Limiter cette dégradation peut également être un moyen d'augmenter les teneurs en ascorbate dans la plante ; les procédés de dégradation étant irréversibles, une perte du pool d'ascorbate est observée. Plusieurs voies cataboliques de l'AsA et du DHA existent. Les composés de dégradation peuvent en effet varier selon les plantes étudiées. L'AsA est ainsi dégradé en tartrate dans les baies de raisins et autres plantes de la famille des Vitaceae (Melino et al., 2009) à la suite d'une réaction enzymatique (DeBolt et al., 2006) via l'idonate (l'unique enzyme identifié étant L-idonate déshydrogénase). Ce fonctionnement est typique des plantes dites tartrate-accumulatrices (le tartrate est l'acide principal de la baie de raisin et intervient dans le goût et le potentiel de vinification). La position terminale du tartrate dans cette voie de synthèse entraîne son accumulation au cours du développement de la grappe de raisin, cependant la quantité d'ascorbate déviée vers cette voie resterait relativement faible (Melino et al., 2009).

Une voie de dégradation de l'ascorbate a été proposée dans l'apoplasme (Green et Fry, 2005) mais il n'est pas à exclure que cette voie ou d'autres voies puissent exister dans d'autres compartiments. La dégradation de l'ascorbate se déroule à partir du DHA de façon non enzymatique ou enzymatique (**Figure 9**). Des modèles *in-vitro* ont amené la conclusion que la dégradation du DHA se déroulait de deux façons : une oxydation du DHA en oxalyl esters, oxalate ou thréonate, ou une hydrolyse (en cas de faibles conditions d'oxydation) en 2,3-diketogulonate (DKG), produit lui-même hydrolysable en carboxypentonates (Parsons et al., 2011). En présence d'H₂O₂ (forte condition d'oxydation), le DKG peut par ailleurs être oxydé en deux produits non identifiés, pouvant s'oxyder en thréonate (Parsons et Fry, 2012). Les conditions de formation de ces produits peuvent cependant ne pas être réalisables *in-vivo* (faible oxydation pour former le DKG et forte oxydation pour former ces produits inconnus, même si le DKG peut être transporté dans un compartiment plus oxydé ou que les conditions de l'environnement peuvent varier).

Pour illustrer cette variété des voies cataboliques de l'acide ascorbique dans le règne végétal, quelques exemples : le thréonate est le produit de dégradation chez le géranium citron (Helsper and Loewus, 1982) ; l'oxalate chez l'oseille, le trèfle, le bégonia et l'épinard (Yang and Loewus, 1975) ; le tartrate chez le raisin comme précédemment énoncé (Melino et al., 2009). On ne connaît pas les produits de dégradation s'accumulant chez la tomate.

L'oxalate, composé de dégradation de l'ascorbate chez le rosier, est un acide de très petite taille qui doit pouvoir diffuser à travers les membranes. La localisation des produits de dégradation de l'ascorbate dans les organes de la plante dépend du composé terminal de dégradation et de son possible rôle. Il est admis que l'oxalate provenant de la dégradation de l'ascorbate peut se lier avec le calcium et former des cristaux insolubles localisés dans les parois cellulaires (Franceschi et Nakata, 2005). L'oxalate dans les cellules peut également être observé sous sa forme acide libre ou bien encore sous forme de sel de potassium, sodium, magnésium que l'on peut localiser dans les vacuoles principalement (Khan, 1995). On peut le retrouver à des teneurs très élevées, jusqu'à 80% de la matière sèche (Libert et Franceschi, 1987). Les espèces dites tartrate-accumulatrice (raisin) stockent sous forme de sel le tartrate issu de la dégradation de l'ascorbate dans les fruits au cours de la maturation jusqu'à une phase de plateau à 50 jours après anthèse (Melino et al., 2009; Saito et Kasai, 1968). Dans les phases tardives de la maturation, le tartrate peut être de nouveau libéré sous sa forme acide libre. Dans un objectif global d'amélioration de la teneur en ascorbate, le contrôle de la dégradation peut s'avérer important alors que c'est une réaction irréversible qui convertit le DHA en produit(s) de dégradation, le pool d'ascorbate disponible se retrouve donc affecté. La compréhension des mécanismes impliquant la dégradation du pool doit donc être améliorée, notamment le lien entre conditions environnementales et dégradation. On ne peut empêcher cette dégradation qui peut se produire spontanément, mais il faut pouvoir la limiter.

Variabilité de la concentration en ascorbate dans les cellules, les organes, les plantes et le règne végétal

Dans le règne végétal, la concentration en ascorbate est relativement variable selon les genres et les espèces. Les agrumes (cf. historique de la découverte de l'ascorbate) sont réputés pour leur richesse en vitamine C ; 50mg/100gMF. Cependant, les fruits les plus riches en vitamine C se trouvent être des baies d'Amazonie (le camu-camu) qui peuvent en contenir de 2 à 3g/100gMF. Des différences notables existent entre les variétés comme chez le fruit de tomate où la teneur peut varier entre 20mg/100gMF pour les tomates cultivées et 50mg/100gMF pour les tomates sauvages. Cette variabilité génétique forte peut être mise à profit dans le cadre d'une amélioration de la concentration en ascorbate dans les tomates cultivées (par croisement d'espèces).

Au sein de la plante, on note également de fortes disparités dans le gradient d'ascorbate. La forme réduite est assez largement majoritaire dans les tissus, sauf exception telles que dans les racines (Córdoba-Pedregosa et al., 2003) ou bien le liquide apoplastique (où c'est la forme oxydée qui prédomine).

Les organes photosynthétiques et les méristèmes (Loewus et al., 1987), lieux d'une forte activité oxydante, présentent une concentration en ascorbate supérieure aux organes puits (fruits, racines, graines,...). Par ailleurs et en relation avec son activité de défense face aux contraintes abiotiques et biotiques, la teneur en ascorbate est plus forte dans les tissus extérieurs (péricarpe de la tomate par exemple) que dans ceux plus internes (gel de la tomate par exemple ; McCollum, 1946). Ces tissus externes sont en effet soumis à de plus amples et plus rapides changements de leur environnement et nécessitent donc des capacités de défense accrues.

Au niveau cellulaire, l'ascorbate est présent dans tous les compartiments mais à des teneurs différentes. Le péroxysome est l'organelle pouvant contenir le plus d'ascorbate (Zechmann et al., 2011) ; suivent ensuite par ordre décroissant de concentration, le noyau, le chloroplaste, la mitochondrie puis la vacuole. Lors de stress oxydants, cette répartition peut être mise à mal afin d'améliorer la défense de la cellule, cet état étant transitoire. Les plastes et notamment les chloroplastes, compartiments qui peuvent voir leur concentration en ROS augmenter rapidement et provoquer des dommages, ont la capacité d'envoyer des signaux sous forme de ROS vers le noyau de la cellule. Le noyau va ensuite se charger de réorganiser la défense de la cellule et d'envoyer les composés antioxydants vers les compartiments les plus affectés par le stress, dont les chloroplastes (Galvez-Valdivieso and Mullineaux, 2010).

L'apoplaste, première ligne de défense de la plante face aux changements brusques de l'environnement, contient une quantité non négligeable d'ascorbate (jusqu'à 28.7% de la quantité totale d'ascorbate d'une feuille de tabac ; Sanmartin et al., 2003), principale molécule antioxydante fonctionnelle de ce compartiment (avec les polyphénols ; Dietz, 1997). Présent majoritairement sous la forme oxydée dans l'apoplaste, le pool d'ascorbate intervient dans des mécanismes clés du fonctionnement du milieu apoplastique : croissance des cellules, régulation du pH apoplastique, contrôle de l'oxydation de l'apoplaste (Pignocchi et Foyer, 2003). L'ascorbate apoplastique, de par sa position et son état redox, est en première ligne des variations environnementales et agit comme un signal pour la plante. Des cascades de réactions, notamment hormonales, se mettent en place suite à la perception de ce signal.

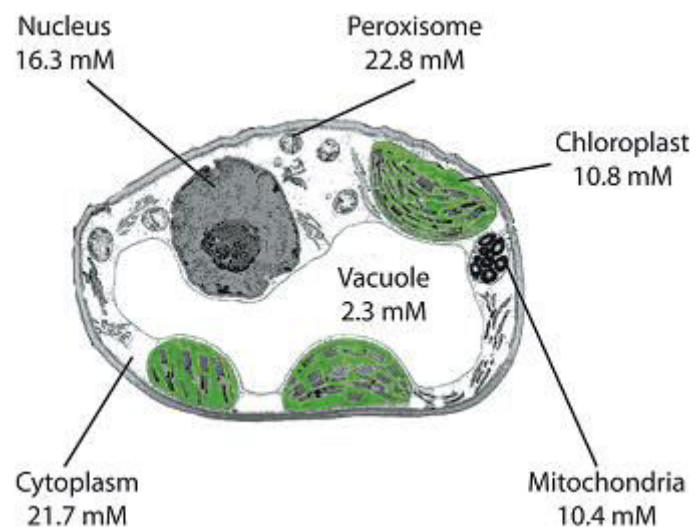


Figure 10 : Localisation de la molécule d'ascorbate et concentration dans les différents compartiments cellulaires. D'après (Zechmann et al., 2011) par Noé Gest.

Le transport de l'ascorbate

L'ascorbate est présent dans tous les compartiments cellulaires (**Figure 10**). En dépit du fait que la dernière étape de synthèse de l'ascorbate se déroule dans la mitochondrie, cet organelle fait partie de ceux (avec les plastes et la vacuole) comportant le moins d'ascorbate (Zechmann et al., 2011). La molécule est donc assez rapidement transportée vers le cytosol après sa synthèse. En période de stress lumineux, l'ascorbate se retrouve dirigée vers le noyau mais surtout vers la vacuole en majorité (Zechmann et al., 2011). L'ascorbate réduit ne peut diffuser librement à travers les membranes (car chargé négativement), son transport est donc réalisé avec l'aide de transporteurs. L'ascorbate sous sa forme DHA, molécule neutre, ne serait lui aussi pas capable de diffuser librement à travers les membranes végétales. Chez les animaux, les transporteurs SVCT1 et SVCT2 (sodium-dépendant) permettraient le transport de la forme réduite de l'ascorbate à travers les membranes (Gournas et al., 2008). La forme oxydée serait quant à elle prise en charge par GLUT1 et GLUT3, deux transporteurs de glucose (Bánhegyi et al., 2014; Vera et al., 1993). A l'inverse des animaux, les transporteurs utilisés chez les plantes ne seraient pas en concurrence avec les transporteurs du glucose (Foyer et Lelandais, 1996; Horemans et al., 2000b). Des transporteurs spécifiques de l'ascorbate seraient impliqués. La forme DHA serait la forme préférentiellement transportée chez la plupart des plantes (Horemans et al., 1997).

Une diffusion facilitée AsA/DHA est également évoquée à travers les membranes. Des études se sont intéressées à des protéines homologues des transporteurs sodium-dépendant (SVCTs) chez les plantes (Maurino et al., 2006), et notamment sur la tomate (Cai et al., 2014). Ces homologues font partie intégrante de la famille des nucléobase ascorbate transporteurs (NAT) (Gournas et al., 2008). Les auteurs retrouvent 12 protéines NAT possiblement exprimées (et régulées par des paramètres environnementaux) présentes dans le génome de la tomate. Récemment, un gène (AtPHT4;4) codant pour un transporteur (identifié comme un membre de la famille des transporteurs de phosphate) d'ascorbate dans la paroi du chloroplaste a été identifié sur *Arabidopsis* (Miyaji et al., 2015).

A l'aide de l'étude de mutants, les auteurs suggèrent également un rôle de ce transporteur dans le cycle des xanthophylles (où l'ascorbate est utilisé comme cofacteur) durant la photosynthèse en condition d'excès de lumière notamment (dissipation de chaleur). Ce transporteur pourrait jouer un rôle primordial dans la réponse du chloroplaste à un stress lumineux.

L'ascorbate peut potentiellement être transportée via le phloème sur de longues distances (Franceschi et Tarlyn, 2002) avec d'autres assimilats pour atteindre les organes dits puits. Les caractéristiques du phloème sont en adéquation avec le maintien de l'ascorbate sous sa forme réduite (pH, milieu fortement réduit,...). De plus, la totalité des enzymes nécessaires à la formation d'ascorbate est présente dans le phloème (Hancock et al., 2003) ce qui indique sa capacité à synthétiser la ascorbate. Cet apport est sans doute négligeable (Hancock et al., 2007).

Les organes puits ont (pour la plupart des espèces) la capacité à synthétiser l'ascorbate. Ces organes seraient partiellement indépendants en ce qui concerne l'accumulation d'ascorbate. Une étude impliquant des traitements drastiques de limitation des sources (feuilles photosynthétiques) présente des résultats intéressants sur tomate (Atkinson et al., 2013). La limitation de l'apport en assimilats (majoritairement des sucres et potentiellement de l'ascorbate) des sources vers les puits n'a pas entraîné de variations de la teneur en ascorbate dans le fruit. La quantité totale d'ascorbate dans la plante est fortement affectée (résultant d'une réduction du poids des fruits et d'une régulation du nombre de fruit par bouquet due à une déficience de l'apport en sucres) mais pas la teneur en ascorbate par fruit. Des résultats similaires ont été décrits par Massot et al sur deux variétés de tomates à taille de fruits contrastée (Massot et al., 2010). L'hypothèse d'une production d'ascorbate dans les feuilles qui serait par la suite transporté vers les fruits est rejetée. La teneur en ascorbate dans les fruits est uniquement reliée à sa synthèse par le fruit (Atkinson et al., 2013). La même conclusion est apportée dans le papier de Gautier et al. (2009). Un traitement d'ombrage est appliqué sur des feuilles et/ou des fruits de tomate. La concentration en ascorbate est diminuée dans le fruit seulement lorsque celui-ci est ombragé, peu importe le traitement subi par les organes sources (ombrage ou non). L'application d'un traitement ombragé sur les feuilles n'affecte pas la teneur dans le fruit, le fruit est donc indépendant en ce qui concerne sa production d'ascorbate. L'analyse de l'expression de gènes dans les feuilles et les fruits de chestnut rose de la voie de biosynthèse ainsi que du cycle de recyclage de l'ascorbate confirme ces hypothèses (Huang et al., 2014). L'étude montre une corrélation entre la teneur en ascorbate dans le fruit et les expressions de gènes codant pour les enzymes GalDH (dernière étape de la voie de biosynthèse) et DHAR (recyclage de l'ascorbate) mesurées dans le fruit. Aucune corrélation entre la teneur en ascorbate dans le fruit et l'expression de ces gènes dans la feuille n'est observée.

Quels sont les facteurs abiotiques influençant la teneur en ascorbate dans la plante ?

La teneur en ascorbate est fortement régulée, voire activée, par l'intensité lumineuse (**Figure 11**). Lors d'un transfert de plantes de l'obscurité vers la lumière, la teneur en ascorbate peut être augmentée de 66% dans les fruits (Hamner et al., 1945), en relation avec le rayonnement perçu par le fruit (Gautier et al., 2009). Un retour à la lumière d'une feuille placée à l'obscurité pendant 5 jours réactive la voie de biosynthèse de l'ascorbate (Tabata et al., 2002). L'activité des gènes reliés à la biosynthèse de l'ascorbate est contrôlée positivement par la lumière (Bartoli et al., 2006; Dowdle et al., 2007; Massot et al. 2013; Li et al., 2010, 2009). Les gènes codants pour les enzymes GMP, GGP et GPP (étapes 5, 7 et 8 de la voie de biosynthèse) voient leurs expressions augmenter à la lumière et diminuer à l'obscurité. Les expressions des autres gènes impliqués dans la synthèse de l'ascorbate sont indifférentes de la lumière et/ou peuvent seulement diminuer à l'obscurité (cas pour l'enzyme GalDH). La synthèse de l'ascorbate en conditions non stressantes est régit à la fois par l'intensité lumineuse et également par le cycle circadien de la plante (Wang et al., 2013). C'est l'activité du gène VTC2 (codant pour l'enzyme GDP-L-Gal phosphorylase) qui serait la plus intimement reliée à ce cycle (Dowdle et al., 2007) et en fait un point de contrôle de la biosynthèse évident. Ce cycle circadien a été observé sur feuille de tomate (Massot et al., 2012) mais n'a pas été confirmé sur fruit du kiwi (Li et al., 2013). VTC2 est par ailleurs stimulé par des stress abiotiques.

Ces résultats ont été précisés par des expérimentations (sur la tomate) discriminant l'impact de la lumière perçue par le fruit ou par la feuille sur la concentration en ascorbate du fruit. L'intensité lumineuse reçue par le fruit s'est avérée fortement corrélée avec la teneur en ascorbate du fruit (Gautier et al., 2009). La photosynthèse puis le transport des sucres (substrat pour la voie de synthèse de l'ascorbate) sont reliés à l'intensité lumineuse perçue par la plante, un point de contrôle par ailleurs essentiel. La voie de biosynthèse est également étroitement liée à la respiration (Bartoli et al., 2006). En effet, la dernière enzyme de la voie Man/Gal est localisée dans la membrane interne de la mitochondrie (lieu de la respiration) et participe dans la chaîne de transfert des électrons. L'intensité lumineuse entraîne une augmentation de l'activité de respiration et de l'activité de l'enzyme de la voie de biosynthèse GalDH. L'étroite relation entre l'ascorbate et la respiration est un autre mécanisme pouvant intervenir dans la corrélation entre teneur en ascorbate et l'intensité lumineuse.

Peu d'études se sont intéressées à l'influence de la lumière sur le recyclage et la dégradation de l'ascorbate. Les activités d'APX, de MDHAR et de DHAR sont augmentées à la lumière (Bartoli et al., 2006; Gallie, 2013a).

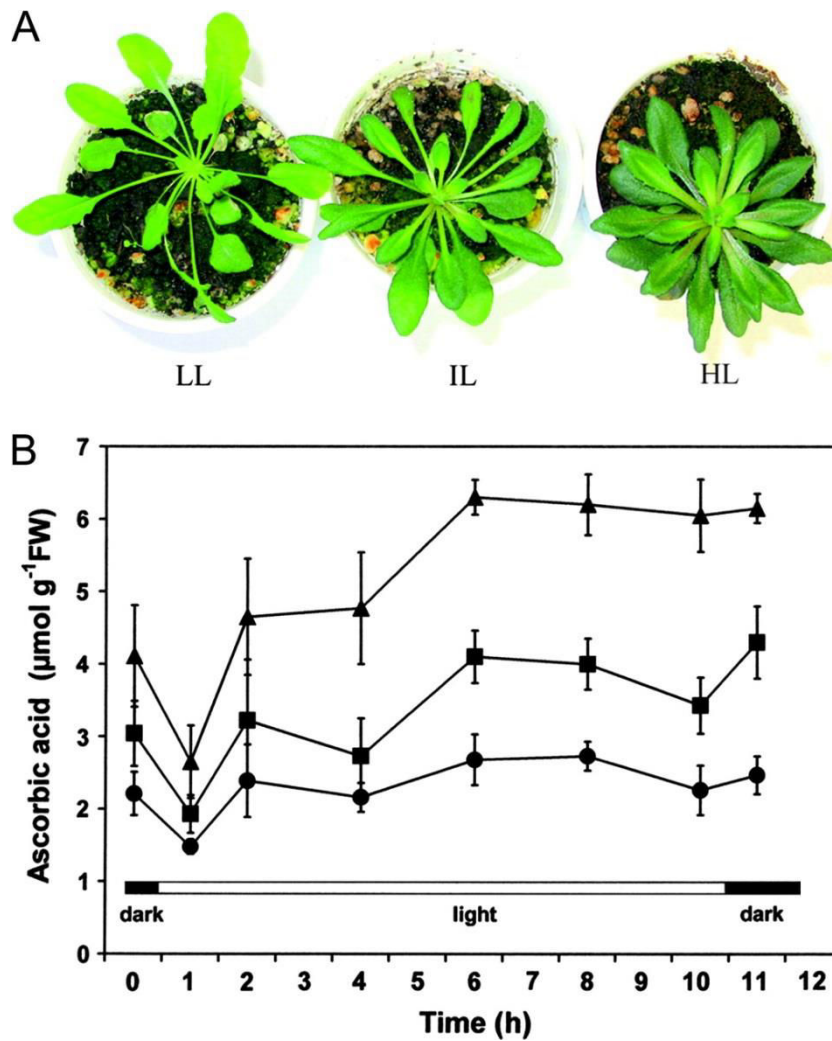


Figure 11 : (A) Influence de l'environnement lumineux sur le phénotype (A) et sur la teneur en ascorbate (B) dans des feuilles d'*Arabidopsis* au cours de la journée. Forte intensité lumineuse (HL, $250 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) représentée par des triangles, intensité lumineuse moyenne (IL, $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) représentée par des carrés, intensité faible (LL, $50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) représentée par des ronds. D'après (Bartoli et al., 2006).

Massot et al. (2013) proposent une étude sur l'impact de traitements combinant différentes intensités lumineuses avec des conditions de température variant de 12°C à 32°C sur des fruits détachés de tomate. Le rayonnement augmente les teneurs en ascorbate des fruits pour les températures inférieures ou égales à 23°C en liaison avec l'augmentation (attendue) des expressions des gènes de la voie de biosynthèse mais également des activités des enzymes de recyclage, particulièrement à 12°C. À forte température (32°C), on observe une diminution du recyclage de l'ascorbate (principalement par l'enzyme DHAR) et une accumulation d'un produit de dégradation de l'ascorbate, le thréonate (Massot et al., 2013). L'enzyme MDHAR est également affecté par des traitements à fortes températures. Chez *Arabidopsis*, l'expression des gènes codant pour les 5 isoformes de MDHAR est diminuée par l'augmentation de la température (Gallie, 2013b). Les conditions de température sont suspectées avoir une influence sur la concentration en ascorbate. Dans une autre étude portant sur des plantes en culture, les auteurs remarquent une augmentation de la teneur en ascorbate dans les fruits conduits sous des températures basses (Liptay et al., 1986). On remarque à l'inverse que des fruits exposés à des températures trop élevées (>31°C) voient leur concentration en ascorbate diminuer (Gautier et al., 2008). Le taux de dégradation est supposé être proportionnel à la taille du pool d'ascorbate dans des conditions de lumières classiques chez *Arabidopsis* (Bartoli et al., 2006) et chez le pois (Pallanca et Smirnoff, 2000). Aucune étude n'a évalué la relation entre intensité lumineuse et taux de dégradation. De fortes températures augmenteraient le taux de dégradation (Massot et al., 2013) dans le fruit. Par ailleurs, l'ascorbate s'oxyde très rapidement et 40% du pool de vitamine C peut être dégradé en 24h dans des feuilles d'*Arabidopsis* détachées et maintenues à l'obscurité (Conklin et al., 1997).

La tolérance à de fortes teneurs en ozone est particulièrement reliée à la taille du pool d'ascorbate et à sa faculté de recyclage (DHAR et MDHAR seraient impliquées). En plus de son action en tant qu'antioxydant, la molécule d'ascorbate agirait également de concert avec les phytohormones dans le réseau de signaux déclenchant la mise en place des réponses à l'ozone (Burkey et al., 2003). Ce phénomène a également été observé lors d'attaques de pathogènes (Barth et al., 2004; Conklin et Barth, 2004). De plus, la présence de métaux lourds dans le milieu entraîne un bouleversement oxydatif dans les cellules. Il est avéré que le cycle ascorbate-glutathion est fortement sollicité dans la tolérance aux métaux lourds (Anjum et al., 2014). L'ensemble de ces études met dans la lumière le rôle prépondérant de la molécule d'ascorbate (par une forte concentration dans les cellules) et de son métabolisme (notamment le cycle de recyclage) dans les réponses aux stress, aussi divers et variés qu'ils puissent être.

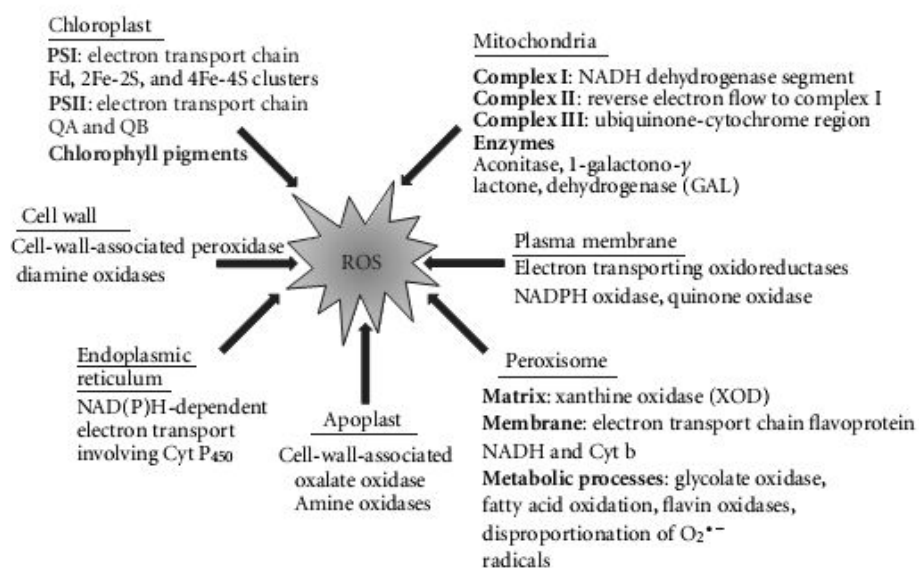


Figure 12 : Sites de production des espèces réactives de l'oxygène chez les plantes. D'après (Sharma et al., 2012).

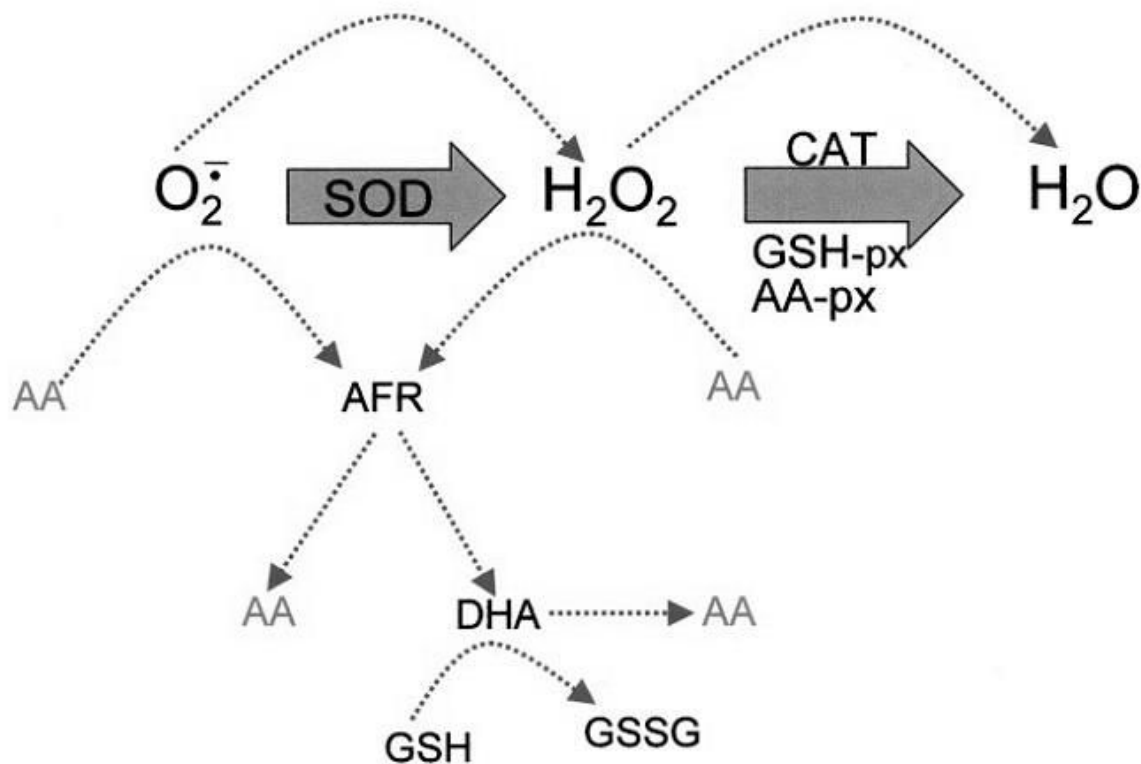


Figure 13 : Action de détoxification des ROS par l'ascorbate réduit (AA). AFR = Ascorbate Free Radical soit le monodéhydroascorbate. GSH-px = Glutathion peroxidase. AA-px = APX = ascorbate peroxidase. D'après (Arrigoni et De Tullio, 2002).

L'ascorbate, une molécule aux multiples rôles

L'ascorbate est une molécule clé du fonctionnement de la plante, intervenant dans de nombreux processus aussi variés que l'expansion cellulaire, la photosynthèse ou la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'ascorbate est un marqueur de la qualité nutritionnelle dans le fruit et participe au maintien de la qualité dans le fruit en post-récolte (Stevens et al., 2008).

L'ASCORBATE, ANTIOXYDANT :

Par son action anti-oxydante, l'acide ascorbique joue un rôle clé dans la détoxification des ROS. Présents en faible quantité, les ROS agissent en tant que messagers pour la réponse de la plante à un stress. Lorsque la concentration en ROS augmente, des dégâts oxydatifs apparaissent : altération de la fluidité des membranes, du transport des ions, diminution de l'activité de certains enzymes, inhibition de la synthèse des protéines, dégradation de l'ADN pour finalement aboutir à la mort de la cellule (Sharma et al., 2012). En conditions de culture optimale pour la plante, la production de ROS durant la photosynthèse et la respiration (Mittler, 2002) est assez faible (**Figure 12**). Cette production augmente drastiquement en cas d'un stress oxydatif (Sharma et al., 2012). L'augmentation d' H_2O_2 observée lors de stress (chilling, salinité, sécheresse, exposition à des métaux lourds,...) est la cause des principaux dégâts infligés aux lipides, protéines et à l'ADN. Pour limiter ces espèces réactives de l'oxygène, la plante possède plusieurs armes et notamment les composés antioxydants. Parmi eux, l'ascorbate est un excellent antioxydant pour plusieurs raisons (**Figure 13**) : il a évidemment les caractéristiques pour réagir avec plusieurs types de radicaux libres ; il est présent en forte quantité dans toutes les cellules ; il se régénère facilement et sans pénaliser d'autres mécanismes cellulaires (Arrigoni et De Tullio, 2002). Ainsi, l'ascorbate voit sa concentration varier (augmenter ou diminuer selon la sévérité du stress) dans les organes touchés par un stress abiotique ou biotique.

L'ASCORBATE, CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT :

L'ascorbate possède un rôle particulièrement essentiel dans la croissance de la plante. En effet, des plantes dans l'incapacité de synthétiser de l'ascorbate ne peuvent se développer au-delà de la germination (Dowdle et al., 2007). La croissance est reliée à la division cellulaire ainsi qu'à l'expansion cellulaire. L'ascorbate est nécessaire dans le bon déroulement du cycle cellulaire. L'AsA stimulerait le passage de la phase G1 à la phase S de la mitose (Liso et al., 1984; Pinto et al., 1999). Le DHA aurait un effet inhibiteur durant la phase G1 uniquement (Potters et al., 2004). De nombreux travaux ont attesté le rôle de l'ascorbate et notamment de ses formes oxydées MDHA et DHA sur l'expansion cellulaire (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Smirnoff, 1996).

En effet, le rapport AsA/DHA pourrait être le signal gouvernant la transition d'un processus de division cellulaire vers les processus d'expansion cellulaire (Córdoba and González-Reyes, 1994). Lorsque la teneur en DHA augmente, le rapport AsA/DHA diminue, ce qui entraîne le déclenchement de l'expansion cellulaire. La forme DHA se révèle quant à elle inhibitrice de l'élongation cellulaire dans des cellules d'oignon (Gonzalez-Reyes et al., 1995).

L'action de l'ascorbate oxydase serait par ailleurs impliquée dans cette transition (Kato et Esaka, 2000). Cette enzyme apoplastique, de la famille des oxydoréductases, catalyse l'oxydation de la forme réduite de l'ascorbate (AsA) en monodéhydroascorbate (MDHA). Le rôle de cette enzyme n'est pas encore clairement défini à ce jour. Lorsque l'activité AO a été augmentée chez le tabac, une accumulation du radical MDHA est observée et une stimulation de la croissance de la cellule est généralement observée. C'est en réalité la relation entre l'hormone de croissance nommée auxine et l'enzyme ascorbate oxydase qui est intrigante. L'auxine est transportée vers les organes en croissance et est impliquée dans les mécanismes physiques et biochimiques responsable de l'élasticité des cellules (Masuda, 1990). Cette accumulation d'auxine dans les régions mitotiques est corrélée avec une augmentation de l'activité de l'ascorbate oxydase. Dans des cellules de potiron, l'auxine agirait en fait comme un promoteur de l'activité spécifique de l'enzyme et du nombre d'ARN messager associés à la synthèse d'ascorbate oxydase (Esaka et al., 1992). Les auteurs concluent alors sur le rôle de l'ascorbate oxydase dans le processus de croissance cellulaire. Le monodéhydroascorbate provenant de l'activité de l'ascorbate oxydase joue ainsi un rôle essentiel dans l'expansion cellulaire. Le MDHA entrerait en jeu dans les réactions améliorant l'élasticité des parois cellulaires en croissance (Schopfer et al., 2002) et/ou dans l'élargissement des vacuoles dans le cytosol provoquant ainsi l'élongation cellulaire (Smirnoff and Wheeler, 2000). L'ascorbate oxydase est stimulée par l'auxine mais peut en retour exercer un rétrocontrôle sur celle-ci. *In vivo*, l'auxine peut se retrouver décarboxylé. Une telle réaction est responsable d'un retard de croissance des cellules. Des études *in vitro* ont mis en lumière le rôle oxydatif de l'ascorbate oxydase sur cette réaction de décarboxylation de l'hormone (Kerk et al., 2000). L'enzyme serait ainsi le candidat idéal pour catalyser cette dégradation. L'ascorbate oxydase jouerait donc un rôle dans la régulation de l'auxine dans les régions mitotiques.

La forme partiellement oxydée MDHA peut être par la suite réduite par l'enzyme MDHAR ou par le cytochrome b561 présent dans les parois cellulaires (Asard et al., 2013; Gonzalez-Reyes et al., 1995). Le cytochrome b561, localisé dans les parois cellulaires, agit comme l'enzyme MDHAR. Il réduit la forme MDHA en ascorbate dans l'apoplaste en utilisant les électrons fournis par l'ascorbate de l'autre côté de la paroi.

Ce transfert d'électrons assuré par le cytochrome b561 entraîne en conséquence des changements de l'état redox du cytochrome lui-même (Horemans et al., 1994). Ces changements (Asard et al., 2013; Horemans et al., 2000a) permettent ensuite des modifications dans la structure des parois cellulaires (synthèse des protéines membranaires, extension de la paroi, croissance des cellules). Le couple AsA/MDHA est le seul impliqué dans ces processus (le changement redox AsA/DHA n'étant pas impliqué).

La forme partiellement oxydée MDHA, si elle n'est pas réduite en AsA, subit le phénomène de disproportionation. Cela consiste en une réaction redox où l'espèce radicalaire MDHA subit simultanément une réduction et une oxydation pour aboutir à la formation d'une molécule réduite d'AsA et une molécule oxydée de DHA. Les réactions suivantes de dégradation de l'ascorbate via la molécule de DHA sont souvent liées avec les processus d'élongation cellulaire. Une oxydation du pool d'ascorbate via l'enzyme ascorbate oxydase (AO) est une première étape vers la dégradation de l'ascorbate. Le DHA peut alors être converti en oxalate à la suite de ces réactions irréversibles de dégradation (cf partie dégradation). La molécule d'oxalate, un acide fort, va réagir avec l'ion calcium pour aboutir à la formation de cristaux d'oxalate de calcium. L'oxalate à l'origine de ces cristaux peut être formé à partir du glycollate, glyoxylate, oxaloacetate ou bien encore de l'activité de l'isocitrate. Cependant, l'ascorbate est considéré comme le précurseur majoritaire de l'oxalate dans la majorité des plantes (Franceschi et Nakata, 2005; Yang and Loewus, 1975). L'ascorbate est en effet le candidat idéal. La molécule est présente en grande quantité et dans tous les tissus végétaux tout comme les cristaux d'oxalate de calcium (Kostman et al., 2001; Nakata, 2003; Nakata et McConn, 2007). Présents dans une grande variété d'espèces animales et végétales, ces cristaux, en plus d'assurer la régulation du pool de calcium dans les cellules (90% du calcium de la plante est sous cette forme, lié avec l'oxalate) et d'intervenir dans certains mécanismes de défense contre l'herbivorie notamment, sont fortement impliqués dans la croissance cellulaire (Franceschi et Nakata, 2005; Nakata, 2012; Nakata et McConn, 2003a). Des plantes (*Medicago*) accumulant de fortes teneurs en oxalate de calcium (*cod4*) voient leur croissance et également leur teneur en chlorophylle diminuer en comparaison avec le témoin (Nakata et McConn, 2003b). Des mutants accumulant très peu de cristaux de calcium oxalate ne sont pas affectés en termes de croissance et développement (Nakata et McConn, 2003a). L'oxalate est un produit stable mais peut être dégradé par l'enzyme oxalate oxydase pour aboutir à la génération de CO₂ et d'H₂O₂ (Lane, 1994). Cette réaction catalysée par l'oxalate oxydase peut intervenir dans la croissance cellulaire en augmentant les propriétés d'élasticité des parois cellulaires (Burbridge et al., 2014).

Par ailleurs, l'ascorbate est une molécule présentant un fort pouvoir réducteur mais elle peut également agir comme pro-oxydant et aboutir à la génération d'espèces réactives de l'oxygène telles que l' H_2O_2 et le radical OH, notamment au niveau des parois cellulaires et de l'apoplaste (Fry, 1998). Le radical OH est potentiellement capable de provoquer des scissions non enzymatiques des polysaccharides présents dans les parois. Cela augmente l'élasticité des parois et facilite donc l'expansion cellulaire.

Tous ces études mises bout à bout soulignent le rôle central de l'ascorbate dans la division et la croissance cellulaire.

L'ASCORBATE, FLORESCENCE ET SENESCENCE :

L'acide ascorbique aurait également un rôle dans la régulation des mécanismes de floraison. Le travail de l'équipe de De Tullio sur la relation entre la floraison et la teneur en ascorbate sont remarquables. Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ayant des teneurs en ascorbate faibles présentent une floraison précoce. A l'inverse, de hautes teneurs en ascorbate sont en corrélation avec des retards de floraison (Attolico et De Tullio, 2006). Il est fort intéressant de noter que ces différences sont dépendantes de la durée du jour. Les mutants *vtc1* (teneur en ascorbate faible) ont une floraison avancée lors de jours longs, et retardée lors de jours courts (Kotchoni et al., 2009). Les processus de floraison sont contrôlés par des facteurs externes tels que l'intensité lumineuse mais également par des phytohormones. Afin d'expliquer ce phénomène, il faut prendre en compte que la molécule d'ascorbate interagit avec les phytohormones acide gibbérellique (GA) et acide abscissique (ABA). Ces deux phytohormones sont liées aux processus de floraison (transition d'un état végétatif vers un stade reproductif). L'ascorbate agit comme un cofacteur dans les voies de biosynthèse de ces phytohormones (Pastori et al., 2003). Il est intéressant de noter que l'action de l'acide gibbérellique sur la floraison dépend du rythme circadien, agissant seulement lors des jours courts. Des travaux récents mettent en lumière l'action du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme facteur d'induction florale (Lokhande et al., 2003). Cette hypothèse a été confirmée par des corrélations entre l'activité de l'ascorbate peroxidase et la florescence (Ye et al., 2000) ainsi que par des travaux récents sur des mutants sous exprimant l'activité de l'enzyme ascorbate peroxidase (APX), qui piègent l' H_2O_2 , et qui présentent une floraison précoce (Chai et al., 2014).

La teneur en ascorbate dans la plante est également corrélée avec la programmation de la sénescence des cellules. Une forte concentration en ascorbate retarderait le déclenchement des processus de sénescence (Barth et al., 2006). La concentration en ascorbate (ainsi que les mécanismes de compensation) dans les cellules serait liée avec la programmation de la sénescence des cellules (Pavet et al., 2005).

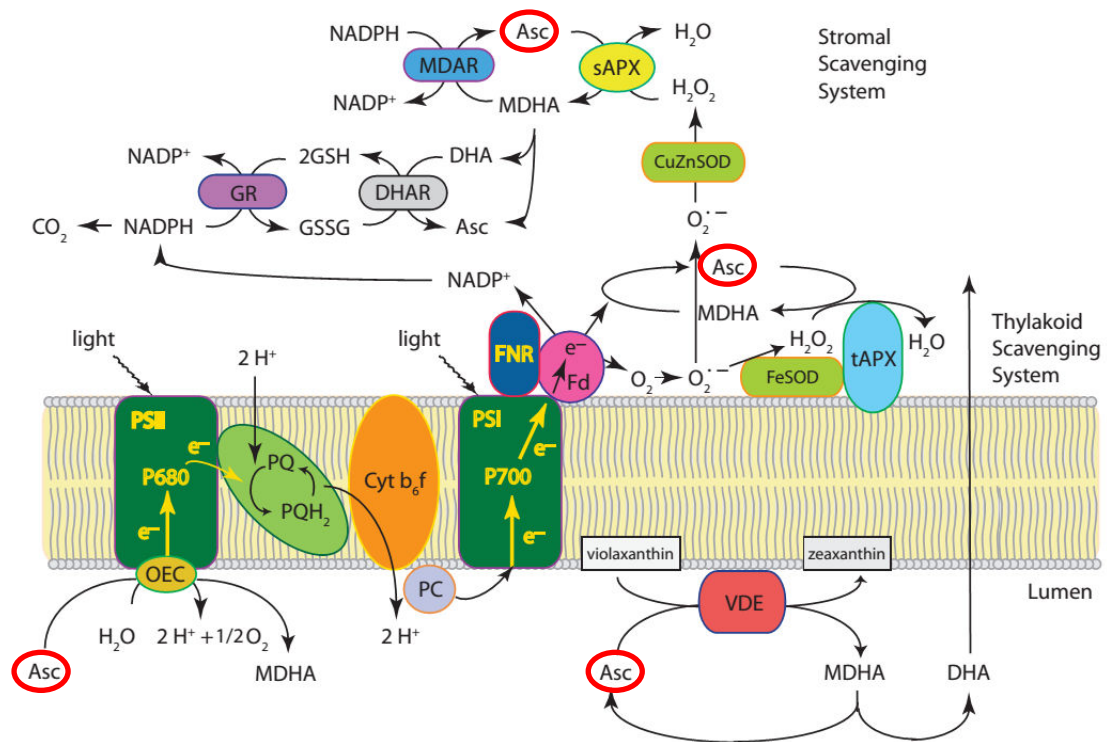


Figure 14 : Rôle de l'ascorbate dans le fonctionnement de la photosynthèse en limitant l'accumulation de ROS. L'ascorbate (entouré en rouge) agit en tant que cofacteur dans la protection des photosystèmes. D'après (Gallie, 2013b).

L'ASCORBATE, PHOTOSYNTHESE ET COFACTEUR :

L'ascorbate agit également comme un cofacteur pour de nombreuses enzymes (des dioxygénases pour la plupart) contenant un site actif avec du fer ou du cuivre (Arrigoni et De Tullio, 2002; Prescott et John, 1996). L'ion métallique est maintenu sous sa forme réduite par l'ascorbate. La présence d'ascorbate est ainsi requise pour la synthèse de composés essentiels du fonctionnement des plantes tels que l'éthylène (Prescott et John, 1996), les anthocyanes (Page et al., 2012) et l'acide gibbérélique (Pastori et al., 2003). Par ailleurs, c'est également en tant que cofacteur que l'ascorbate agit dans la protection des photosystèmes (**Figure 14**). En cas de forte intensité lumineuse, la chaîne de transport d'électrons peut être surchargée. L'énergie lumineuse est supérieure à la capacité maximum de fonctionnement de la photosynthèse. Il en résulte une saturation de la chaîne de transport des électrons qui entraîne la formation de ROS (ici l' O_2^-). Au niveau du photosystème I, l' O_2^- est transformé en H_2O_2 puis réduit en H_2O par l'ascorbate (formation de MDHA) (Smirnoff, 2000) dans ce que l'on nomme le cycle eau-eau. Ce cycle eau-eau est primordial dans la photo-protection du chloroplaste. Des électrons provenant de la ferrédoxine ou bien l'action de l'enzyme MDHAR permettent par la suite de régénérer le MDHA en AsA. Au niveau du photosystème II, c'est un phénomène de dissipation thermique (ou quenching non photochimique) qui permet d'éliminer l'excès d'énergie lumineuse. Il en résulte la formation de xanthophylles. L'ascorbate est impliqué dans le cycle des xanthophylles comme cofacteur (Eskling et al., 1997; Smirnoff, 2000). En effet, la formation de zéaxanthine et d'anthéaxanthine à partir de la forme violaxanthine est catalysée par la violaxanthine dé-époxydase et nécessite la molécule d'ascorbate. L'ascorbate participe donc au bon fonctionnement de la cellule photosynthétique.

Au travers de cette étude bibliographique et des travaux précédents réalisés au sein des laboratoires PSH et GAFL, nous identifions clairement le rôle essentiel du métabolisme de l'ascorbate dans les fonctions primaires (croissance, développement) et de défense de la plante, ainsi que l'étroite relation entre son métabolisme et les paramètres environnementaux. Cependant, parmi ces mécanismes impactés par l'ascorbate, un grand nombre n'est pas correctement identifié ni compris à l'heure actuelle. Cela reflète la grande complexité de la régulation génétique et environnementale du métabolisme de l'ascorbate et de ses relations avec d'autres processus physiologiques et métaboliques. Devant cet état de fait, les objectifs détaillés ci-après ont été traités au cours de cette thèse dans l'optique d'améliorer la compréhension globale de la régulation de métabolisme de l'ascorbate.

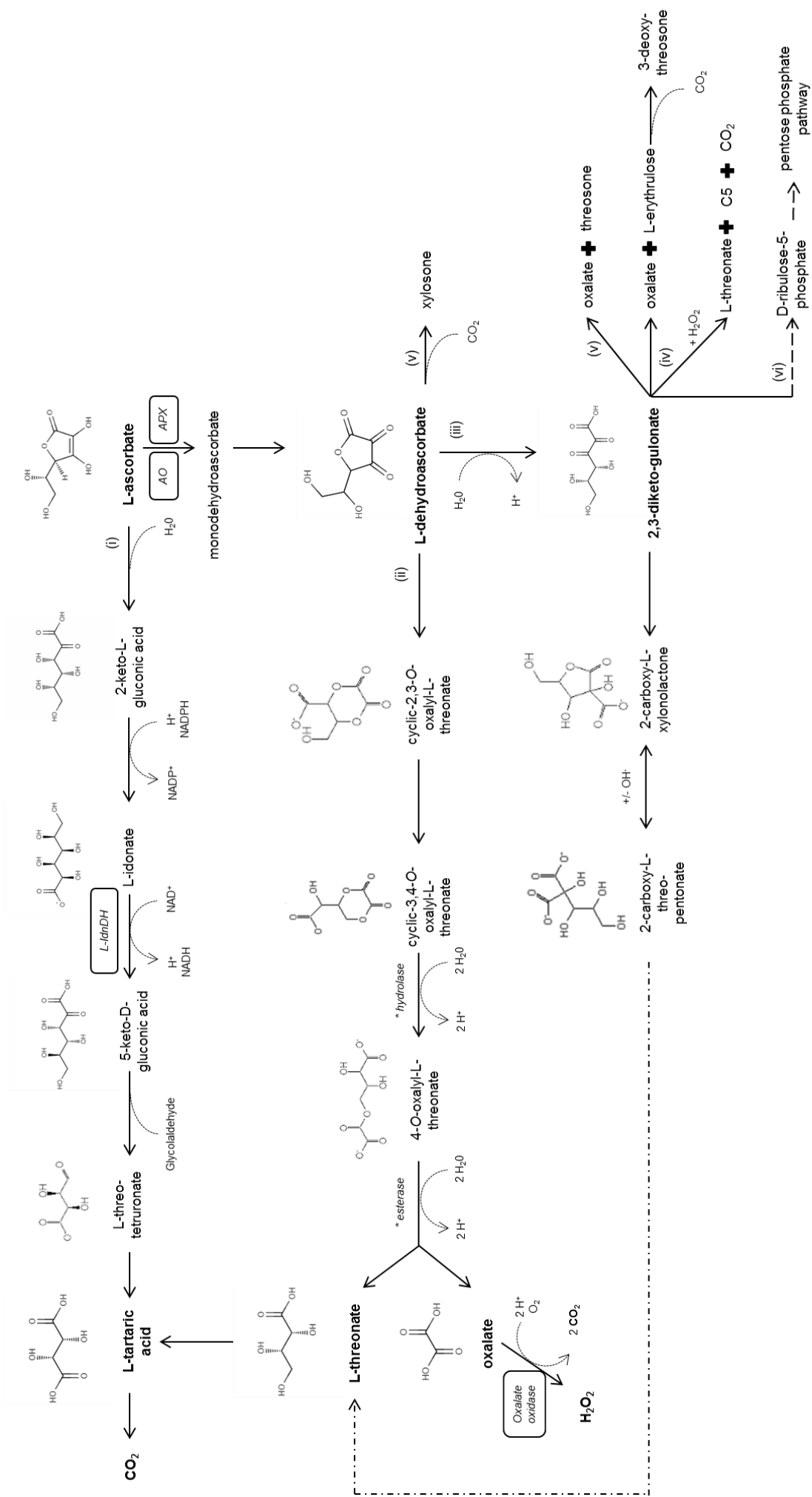


Figure 15: Ascorbate degradation pathways identified in (i) Vitaceae (tartaric acid pathway), (ii) Geraniaceae (DHA pathway), (iii) *in vitro* Rosa cells (DKG pathway), (iv) mammals, (v) human lens and (vi) bacteria. Enzymes except L-IdnDH (L-idonate dehydrogenase), AO (ascorbate oxidase), APX (ascorbate peroxidase), oxalate oxidase, esterase and hydrolase from oxalate pathway and those of the bacteria degradation pathway (not indicated here) are not required or identified yet. Adapted from (i) DeBolt et al., 2006, 2004; Melino et al., 2009 (ii) Green and Fry, 2005; Hancock and Viola, 2005; Lane, 1994 (iii) Parsons et al., 2011 (iv) Linster and Van Schaftingen, 2007; Simpson and Ortwerth, 2000 (v) Nemet and Monnier, 2011 and (vi) Yew and Gerlt, 2002.

Présentation du travail de thèse :

Précédant mon arrivée au laboratoire, des phénotypes particuliers concernant les plantes sous exprimant l'enzyme MDHAR ont été observés sur un génotype de tomate cerise. En effet, les plantules de ces lignées présentent une croissance ralentie. Cette différence de croissance au stade juvénile n'est pas conservée sur des plantes âgées de 45 jours. Sur ces plantes adultes, on observe des fruits plus petits au terme de leur maturation. Aucune différence morphologique n'est notée entre les lignées témoins et sur-exprimant l'enzyme MDHAR. De plus, des lignées sous-exprimant l'enzyme AO ont été étudiées (Garchery et al., 2013). Ces dernières présentent un phénotype inverse à celui observé sur les lignées sous exprimant MDHAR avec une taille de fruit et un rendement augmentés sous conditions stressantes. Le couple MDHAR/AO utilise respectivement l'ascorbate comme produit (cas de MDHAR) ou substrat (cas d'AO), et le monodéhydroascorbate comme substrat (cas de MDHAR) ou produit (cas d'AO). Le rapport MDHAR/AO semble représenter un signal fort dans la croissance des organes puits. En effet, le statut redox de l'ascorbate régit fortement le statut redox de la cellule, ce dernier entretenant d'étroits liens avec les phénomènes de croissance et de développement de la plante. Ces relations entre métabolisme de l'ascorbate et fonctionnement de la plante seront approfondies par les travaux de ma thèse sous l'influence de l'environnement dans les **chapitres 1 et 2** à travers les questions suivantes :

- Quelles sont les modifications physiologiques et métaboliques responsables des phénotypes croissance ralentie et petits fruits de nos lignées sous exprimant l'enzyme MDHAR ?
- Ces phénotypes sont-ils observés dans d'autres fonds génétique ?

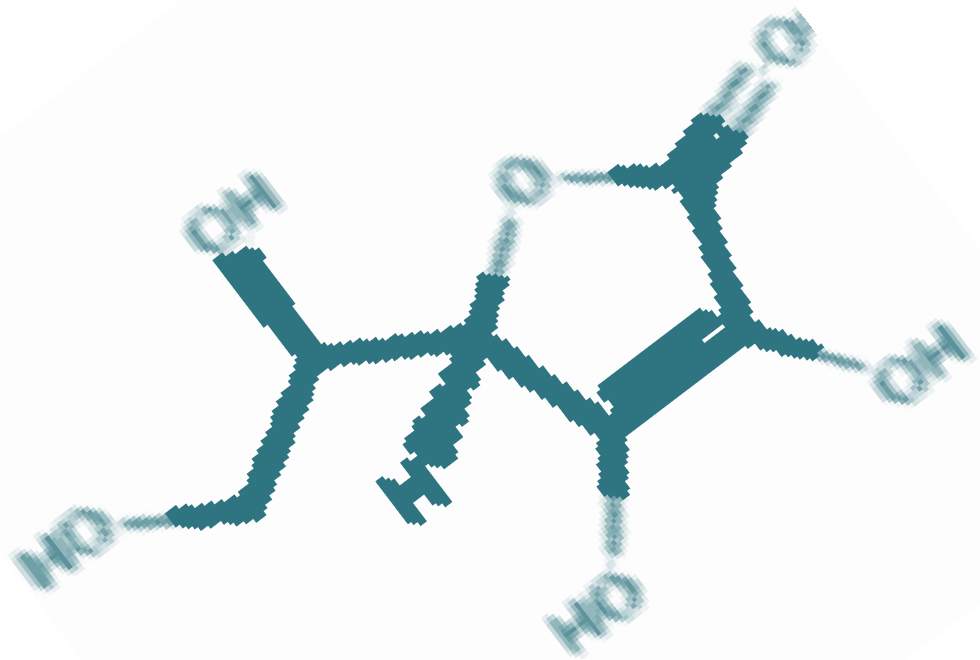
Par ailleurs, dans le cadre de ma thèse, je m'intéresse aux leviers génétiques et environnementaux impliqués dans la régulation de la teneur en ascorbate dans les plantes. Au travers de l'étude bibliographique, nous avons identifié des points clés de régulation dont la connaissance actuelle est faible. Une partie significative de mon travail de thèse s'inscrit dans la compréhension du mécanisme de dégradation de l'ascorbate. La **figure 15** présente un état de l'art précédant les travaux de ma thèse concernant la dégradation de l'ascorbate chez les plantes mais également chez les mammifères. L'ascorbate, une fois oxydée en DHA, va, s'il n'est pas réduit enzymatiquement, s'oxyder ou s'hydrolyser de façon irréversible et par conséquent entraîner une diminution du pool d'ascorbate. Les mécanismes entraînant la dégradation de l'ascorbate chez les plantes ne sont pas bien connus.

Il a été proposé (Green et Fry, 2005) que la dégradation de l'ascorbate (dans l'apoplasme de cellules du Rosier) se déroule à partir du DHA de façon non enzymatique ou enzymatique. La dégradation *in vitro* du DHA peut se dérouler de deux façons : une oxydation du DHA en oxalyl esters, oxalate ou thréonate ; ou une hydrolyse (en cas de faibles conditions d'oxydation) en 2,3-diketogulonate (DKG), produit lui-même hydrolysable en carboxypentonates (Parsons et al., 2011; Parsons et Fry, 2012). Les produits terminaux de dégradation de l'ascorbate ont été identifiés chez certaines espèces. Le thréonate est le produit de dégradation chez le géranium citron (Helsper and Loewus, 1982) ; l'oxalate chez l'oseille, le trèfle, le bégonia et l'épinard (Yang and Loewus, 1975) ; le tartrate chez le raisin (Melino et al., 2009). Il existe donc une variabilité interspécifique. Durant mon parcours de thèse, l'espèce modèle des plantes à fruits charnus étudiée est la tomate. Ces molécules n'ont pas fait l'objet d'études approfondies chez la tomate.

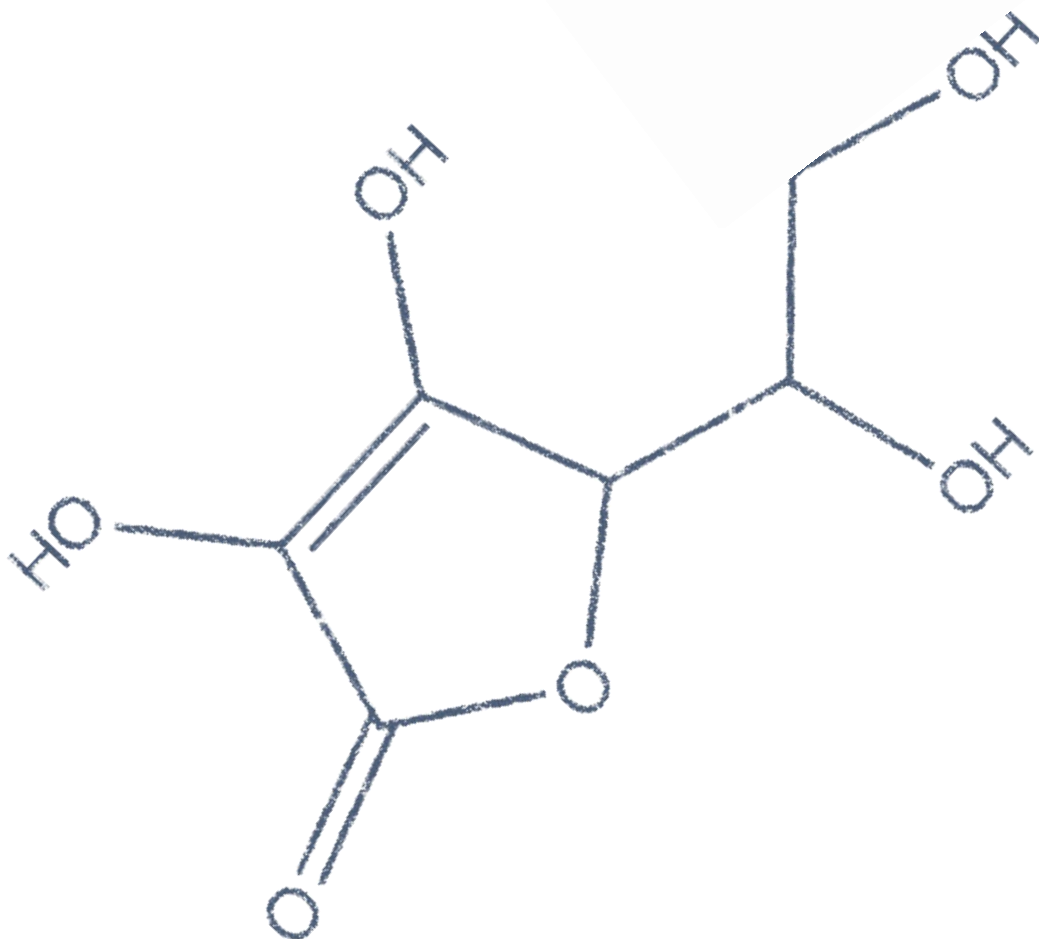
Par ailleurs, les études précédentes mettent en avant le rôle de la lumière et de l'obscurité sur la taille du pool d'ascorbate. Des liens étroits existent par ailleurs entre la biosynthèse, le recyclage et l'intensité lumineuse. Ces recherches s'inscrivent dans un thème global d'impact du changement climatique sur le fonctionnement des plantes. Les prévisions à long terme indiquent qu'une modification de l'environnement lumineux (forte intensité lumineuse par exemple) et thermique est à prévoir, pouvant entraîner des conditions stressantes pour les plantes. En plus de réguler l'état redox des cellules, l'ascorbate est un antioxydant majeur dans la défense des plantes. Ainsi, il devient essentiel d'identifier l'impact de changements dans l'environnement des plantes sur le pool d'ascorbate. La dégradation de l'ascorbate étant l'étape de régulation du pool la moins étudiée, mes travaux présentés dans le **chapitre 3** ont eu pour objectifs de déterminer :

- 1) Quelle est la nature des produits de dégradation de l'ascorbate dans les feuilles et les fruits de tomate ?
- 2) Quel est l'impact de l'environnement sur le taux de dégradation ?

Il est également fort intéressant d'étudier s'il existe des interactions et un rétrocontrôle entre les différentes étapes de régulation de l'ascorbate que sont la biosynthèse, le recyclage et la dégradation. On sait qu'il existe des connexions entre ces boîtes de régulation (par exemple, la taille du pool d'ascorbate agit comme un rétrocontrôle de la voie de biosynthèse). A l'inverse, on ne sait pas quel est l'impact d'une modification du taux de recyclage sur le taux de dégradation de l'ascorbate. Nous aborderons cette interrogation dans le **chapitre 3** également.



Matériels et méthodes



Présentation du matériel végétal

Le matériel végétal suivant a été utilisé dans le cadre de mon travail de thèse :

Tomate de type cerise, croissance indéterminée : Solanum lycopersicum L. West Virginia 106

Cette variété présente une croissance rapide, des fruits homogènes de petite taille et peut être facilement transformée par l'insertion de vecteurs RNAi ou 35S par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

Tomate à gros fruit, croissance indéterminée : Solanum lycopersicum L. Moneymaker

C'est une variété de tomate commerciale à croissance indéterminée. Les fruits sont de gros calibre destinés au marché de la consommation de tomate en frais. Moneymaker est une variété de tomate optimisée pour l'utilisation des ressources carbonées, d'où son utilisation en conditions de faible intensité lumineuse dans les pays du Nord de l'Europe.

Génotype « nain », croissance déterminée : Solanum lycopersicum L. Micro-Tom.

Cette variété est de type miniature (10 à 20 cm de hauteur), présentant un port compact et étant très productive en termes de fruits. L'ensemble de ces qualités en fait un choix parfait pour la recherche. Son cycle est assez court (70-90 jours de la plantation à la maturation du fruit). La variété est facilement transformée génétiquement.

Le phénotype nain de la variété est dû à la mutation des gènes dits SP pour « Self Pruning » et D pour « Dwarf ». Le gène SP est responsable de la croissance déterminée de la plante. Le gène est exprimé dans tous les organes végétatifs et reproductifs de la plante et réduit l'expansion de ceux-ci.

génotype	type de transformation	gène affecté
WVA106	RNAi & 35S	MDHAR
Micro-Tom	RNAi & 35S	MDHAR
Moneymaker	RNAi	MDHAR & AO

Tableau 1 : Différentes transformations génétiques utilisées lors des travaux de thèse

Transformation génétique

Des graines de tomates sont déposées sur un milieu de germination, puis après émergence des cotylédons, les nervures centrales sont sectionnées afin de générer des explants. Ces explants sont placés en boîte de Petri et mis en contact avec *Agrobacterium tumefaciens* qui contient le transgène à insérer pendant une période de 48h d'incubation à l'obscurité à 28°C. Le gène d'intérêt contenu dans le plasmide est ainsi intégré au génome des cellules de l'explant grâce à l'action d'*Agrobacterium tumefaciens*. Afin de trier les explants ayant intégré ou non le gène d'intérêt, on les dépose sur un milieu MS contenant du timentin, de la zeatine et un antibiotique de sélection. Cet antibiotique va permettre le tri des lignées puisque seuls les explants ayant intégré le transgène ont également le gène de résistance à l'antibiotique et pourront ainsi former des pousses dans ce milieu. On les isole enfin sur un milieu ½ MS et on permet leur enracinement jusqu'à obtenir des plantules que l'on va transférer en serre confinée. Les plantes obtenues serviront de réservoir de graines de plantes transformées.

A l'aide de la technique d'ARN interférent (RNAi) spécifique du gène MDHAR localisé sur le chromosome 9 (MDHAR3, SGN-U573751, bin9D, (Stevens et al., 2007)) des lignées sous-exprimant l'enzyme MDHAR sont obtenues. Les lignées sur-exprimant l'enzyme MDHAR sont obtenues par l'insertion d'un transgène contenant un promoteur 35S en amont de l'ADNc du gène MDHAR3. Les transformations utilisées sur les différents génotypes étudiés au cours de cette thèse sont résumées dans le **tableau 1**.

Conditions de cultures et suivi de la physiologie de la plante

Les différents génotypes (cf. description des génotypes) utilisés au cours de cette thèse ont été étudiés sous différentes conditions environnementales dépendantes du lieu de culture : sous serre (type Venlo) ou en enceinte climatique. Les conditions microclimatiques de culture des plantes sont enregistrées pour chaque expérimentation par des capteurs spécifiques : vitesse du vent, teneur en CO₂, rayonnement, humidité relative et température.

La caractérisation de la croissance de la plante est réalisée par des mesures de matière fraîche et sèche (après passage à l'étuve pendant 72h à 70°C) ainsi que par des mesures à l'aide d'un pied à coulisse (longueur de tige, diamètre des fruits) et d'analyse d'images par le logiciel Image J (surface foliaire). La température foliaire est enregistrée à l'aide d'un capteur infrarouge (MT150 Bioblock).

Mesure de l'activité photosynthétique

Principe : L'énergie lumineuse va être convertie en énergie chimique par une chaîne de réactions faisant intervenir les photosystèmes I et II. La mesure du taux d'assimilation par le cycle de Calvin du CO₂ par la plante permet d'estimer l'activité photosynthétique. Plus la quantité de CO₂ assimilée est forte, plus l'activité photosynthétique augmente. L'efficacité de ces processus est surveillée par des mesures de fluorescence. La conversion photochimique est maximale lorsque les conditions sont optimales, la fluorescence est alors minimale ($F_v/F_m \geq 0.85$). Lorsque la plante est en situation de stress, une partie de l'énergie arrivant au niveau du PSII ne pouvant pas être transformée en énergie chimique peut être émise par fluorescence (entraînant une diminution du ratio $F_v/F_m < 0.85$).

Mesure : L'assimilation du CO₂ par la feuille de tomate est évaluée par l'appareil de mesure LI-6400 XT (LI-COR Biosciences) avec les différents paramètres réglés comme suit : intensité lumineuse choisie en fonction de l'expérimentation (1000 ou 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) température à 25°C, 600ppm CO₂, 60% d'humidité relative, flux d'air 500ml.s⁻¹. L'efficacité du photosystème II est évaluée à l'aide de mesures de fluorescence par l'appareil de mesure Handy-PEA (Fluorescence Monitoring System (FMS 1, Hansatech®, Kings Lynn, Norfolk, UK)). Après 30 min d'adaptation à l'obscurité (à l'aide de clip fixé sur la feuille), la mesure du F_v/F_m est enregistrée. Les mesures sont répétées sur 6 feuilles de tomate par génotype, à différents moments de la journée.

Prélèvement et préparation d'échantillons

L'organe (foliole, feuille, fruit, racine) est prélevé de la plante, découpé ou non, puis le tissu végétal sélectionné est mis en contact le plus rapidement possible avec l'azote liquide (N₂ liquide). Cette opération permet de figer le métabolisme des cellules ce qui permettra de réaliser les analyses biochimiques dans un second temps. L'échantillon est ensuite broyé dans de l'azote liquide à l'aide du broyeur A11 basic (IKA, Germany), d'un mortier et d'un pilon ou bien encore du broyeur oscillant. La méthode de broyage est choisie en fonction du tissu végétal étudié. La poudre fraîche est ensuite stockée à -80°C. Une portion de l'échantillon n'est pas broyée mais pesée et placée dans une étuve à 70°C pendant 3 jours afin d'estimer le taux de matière sèche de l'échantillon.

Extraction et dosage de l'ascorbate par microplaque

Principe : Le dosage colorimétrique est basé sur la détection du complexe dipyridyl-Fe²⁺ et sur la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ par la molécule réduite d'ascorbate présente dans l'échantillon. L'ascorbate réduit est dosé tandis que la teneur en ascorbate oxydée est

estimée par différence entre la concentration en ascorbate total (après complète réduction du pool par un ajout d'un agent réducteur) et l'ascorbate réduit. D'après Stevens et al., 2007.

Préparation :

Acide trichloracétique (TCA) 6%.

Tampon phosphate 0.4M à pH 7.4.

DL-Dithiothréitol (DTT) 5mM (agent réducteur).

N-ethylmaléimide (NEM) 0.5% (permet de neutraliser l'excès de DTT).

Réactif de coloration A : 4.6% TCA + 31% H_3PO_4 + 0.6% $FeCl_3$

Réactif de coloration B : 4% 2,2-Dipyridyl dans éthanol 70%.

Extraction et dosage :

La molécule d'ascorbate est instable et s'oxyde rapidement. Pour conserver son intégrité, il est nécessaire de maintenir les échantillons dans de la glace durant l'extraction. L'extraction est effectuée en milieu acide (afin d'améliorer la stabilité de l'ascorbate) dans 600 μ l TCA 6% (acide trichloroacétique) par agitation au vortex pendant 30 sec. Les extraits sont maintenus dans de la glace pilée. Le surnageant est prélevé pour le dosage en microplaque à 550nm. La mesure d'absorbance est effectuée à 550nm (basée sur la détection du complexe dipyridyl- Fe^{2+}). La concentration en ascorbate total est estimée après complète réduction du pool par l'ajout de DTT. La spécificité de la technique de dosage est permise par l'ajout de l'enzyme ascorbate oxydase qui va oxyder l'ensemble du pool d'ascorbate et d'obtenir l'absorbance des autres espèces réductrices encore présentes dans l'extrait, absorbance que l'on déduira des mesures précédentes.

Extraction du liquide apoplastique dans les feuilles de tomates

Préparation : Tampon d'infiltration : 20mM Glycine pH 2.5; 100mM KCl; 2.5mM EDTA.

Extraction : Dans la serre, trois folioles d'une feuille mature bien exposée sont prélevées et la veine centrale est retirée à l'aide d'un scalpel avant une étape de pesée de l'échantillon. L'échantillon est placé dans un tube Falcon de 50 ml contenant 30 ml de tampon d'infiltration dans la glace. Dans une chambre froide (4°C), infiltrer les folioles sous vide (pompe + cloche) pendant 5 minutes. L'efficacité d'infiltration est estimée lorsque plus de 80% de la feuille présente une coloration mate sombre, preuve que le liquide a bien pénétré dans les espaces intercellulaires (on voit cet effet quand on enlève le vide). Les folioles sont ensuite séchées sur du papier absorbant avant une pesée. Elles sont soigneusement enroulées et insérées dans un tube Falcon de 15ml avec un trou percé par une aiguille, placé dans un autre tube Falcon de 50 ml vide et propre. Centrifuger à 1000g pendant 10 min à 4°C afin de récupérer le liquide apoplastique.

Extraction et dosage du glutathion par microplaque

Principe : Le dosage s'effectue par mesure colorimétrique et est basé sur la détection du DTNB qui en réagissant avec le GSH (glutathion réduit) va produire une molécule de GSSG (glutathion oxydé) et une molécule de 2-nitro-5-thio-benzoic acide (TNB). D'après Griffith, 1980.

Préparation :

Tampon phosphate 0.5M à pH7.

Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) 0.5M à pH7.

Acide 5-sulfosalicylique 5%.

Dinitrothiocyanobenzene (DTNB) 1.5mg/ml dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

4-vinylpyridine 2M dans éthanol 70%.

Extraction et dosage :

Extraire le glutathion par agitation au vortex dans de l'acide 5-sulfosalicylique 5% froid. Le surnageant est dosé en microplaque à 405nm. La mesure du TNB est effectuée à 405nm Cette méthode permet d'estimer la concentration en glutathion total. La forme oxydée GSSG est évaluée après ajout de 4-vinylpyridine qui piège le GSH.

Extraction et dosage des sucres solubles par HPLC

Principe : Les conditions chromatographiques permettent la séparation et la détection du saccharose, du glucose et du fructose présents dans l'échantillon en une seule injection. Une gamme d'étalonnage permet de calculer les concentrations. D'après Gomez et al., 2002.

Préparation :

Mélange méthanol-chloroforme-eau (1/0.6/1).

Polyvinylpyrrolidone (PVPP).

EDTA $2\text{Na}^+ \text{Ca}^{2+}$ à 50mg/L.

Extraction et dosage :

L'extraction se réalise dans un mélange chloroforme-méthanol-eau. Le surnageant dans la phase supérieure hydroalcoolique est dosé par HPLC après évaporation au Speed-Vac et traitement au PVPP (pour éliminer les phénols) puis purification à l'aide d'une cartouche d'extraction en phase solide C18. Les chaînes apolaires sont piégées sur un filtre de 0.2µm. L'ensemble de ces étapes est réalisé à 4°C. La chaîne HPLC est équipée d'un détecteur réfractométrique stabilisé à 40°C, d'une colonne échangeuse de cations Sugar-Pak I (300 x

6.5mm) placée dans un four à 85°C. La phase mobile est composée d'un mélange EDTA $2\text{Na}^+ \text{Ca}^{2+}$ à 50mg/L.

Préparation d'échantillons de tomate pour analyse métabolomique (GC-MS)

Principe : L'identification et la quantification de tous les métabolites présents dans un échantillon sont effectuées par GC/MS. Elles nécessitent une extraction des métabolites suivie d'une dérivation qui va permettre d'augmenter la volatilité (une silylation qui permet le remplacement de l'hydrogène par un groupement triméthylsilyl (TMS)) de la molécule et permettre sa séparation par chromatographie gazeuse. L'identification est réalisée après fragmentation de la molécule par ionisation électronique et une détection au spectromètre de masse. D'après Roessner et al., 2000.

Préparation :

Standard interne : 0.2mg/ml de ribitol dans de l'eau UP.

10mg/ml de méthoxyamine dans de la pyridine.

Extraction : Travailler sur de la glace. Prélever environ 200mg d'échantillon en poudre fraîche de fruits ou 100mg d'échantillon en poudre fraîche de feuille et déposer dans un tube eppendorf pesé de 2ml contenant 1ml de méthanol préalablement dégazé et 120µl de ribitol. Boucher et vortexer 10 secondes. Peser le tube. Agiter (roue de paillasse) 20 min à 4°C. Ajouter 400µl d'eau UP, vortexer 30 secondes. Centrifuger 2 minutes à 13.2 tr/min (à 4°C). Prélever 5µl de surnageant (dosage des sucres) ou 100µl de surnageant (autres métabolites) et transférer dans un tube eppendorf de 2ml. Evaporer au Speed-Vac pendant 3h sans chauffer. Conserver à -80°C ou dériver immédiatement.

Dérivation : Après 5 minutes de décongélation, ajouter 60µl de méthoxyamine en solution dans la pyridine. Vortexer 10 secondes. Agiter (roue de paillasse) pendant 1h30 à 37°C. Centrifuger pendant 30 secondes. Ajouter 120µl de MSTFA et 8µl d'un mélange d'alcanes. Agiter (roue de paillasse) pendant 30 min à 37°C. Taper le fond du tube sur la paillasse pour faire tomber les gouttes sur le bouchon. Transférer la totalité du volume (environ 190µl) dans un flacon d'injection en PP avec réducteur de volume préalablement identifié. Reposer pendant 2h à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Analyse GCMS :

Les échantillons sont placés sur le passeur automatique AI 3000 et la méthode d'analyse 'metabo ISQ tomate' est chargée. Le système utilisé est un Trace GC Ultra-ISQ GC-MS (Thermo Scientific, Thermo France). Un prélèvement de 1 µl est injecté dans la colonne GC (Thermo TR-5MS (20m x 0.10mm x 0.10 µm)). La température d'injection est de 230°C, la source du spectromètre de masse est chauffée à 200°C. Le gaz vecteur est l'hélium, avec un flux de 0.4 ml.min⁻¹. Le programme de température est respecté : 3.70 min à 70°C, augmentation de 7°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 280°C, puis une seconde augmentation plus rapide à 30°C.min⁻¹ pour atteindre 320°C pendant 1 min. Le spectromètre de masse enregistre 6.6 scans par seconde, avec un *m/z* de 50-650. La bibliothèque de spectres de Golm est utilisée pour l'identification des métabolites. La concentration relative est évaluée à l'aide du standard interne le ribitol. La **figure 16** présente le matériel utilisé, un exemple de profil chromatographique et de spectre de masse.

Dosage de la teneur en anthocyanes dans les feuilles de tomate

Principe : Le dosage est effectué par mesure colorimétrique selon la méthode de Gould et al. (2000).

Extraction et dosage : Le contenu des parties aériennes en anthocyanes a été déterminé selon la méthode de (Gould et al., 2000) avec une légère modification : 0.2 g de fragments de feuilles sont incubés en présence d'un mélange de solvants : HCl-H₂O-MeOH (1/3/16) à l'obscurité et à 4°C pendant 72 heures. Deux longueurs d'ondes différentes sont utilisées pour la lecture de l'absorbance à savoir 653 et 530 nm. La teneur en anthocyanes a été estimée selon la formule suivante : Anthocyanes (µg /ml)= $A_{530}-0.24 \times A_{653}$. Les anthocyanes solubles dans cette solution présentent un spectre d'absorption maximal à 530 nm, le retranchement de (0.24 A_{653}) compense l'excès d'absorption à 530 nm dû à la présence des chlorophylles (Murray et Hackett, 1991).

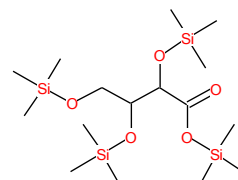


Figure 16 : (a) Matériel d'analyse GCMS (b) profil chromatographique d'une feuille de tomate (c) spectre de masse obtenu pour un composé de dégradation de l'ascorbate : le thréonate

Estimation de l'activité de l'enzyme Monodehydroascorbate Reductase (MDHAR)

Principe : Le radical MDHA est généré par ajout de l'enzyme ascorbate oxydase durant le dosage colorimétrique. L'activité MDHAR est ensuite estimée par la conversion (détectable à 340nm) du NADH en NADP⁺ par l'enzyme MDHAR. D'après Murshed et al., 2008.

Préparation : Tampon d'extraction 50mM Tris-HCl à pH7.8.

Extraction : Prélever 150 mg de poudre fraîche et homogénéiser dans 600µl du tampon d'extraction. Centrifuger pendant 15 min à 4°C à 2500g. Prélever 50µl de surnageant. Dans un volume final de 1ml, ajouter 1mM d'ascorbate, 0.2mM NADH ainsi qu'assez d'ascorbate oxydase (enzyme) pour obtenir une courbe linéaire de production du radical monodéhydroascorbate.

Dosage : La pente initiale à 340nm (sans l'enzyme AO) est enregistrée et soustraite de la pente finale (avec enzyme AO). L'activité est exprimée en µmoles NADH oxydé par gramme de matière fraîche et par minute. Le dosage résulte de l'ensemble des activités des différentes isoformes de MDHAR présentes dans les cellules.

Estimation de l'activité de l'enzyme Ascorbate Oxydase (AO)

Principe : L'activité est estimée par mesure colorimétrique de l'oxydation de la molécule d'ascorbate à 265nm. D'après Sanmartin et al., 2003.

Préparation :

0.1M tampon phosphate pH 5.6, 0.5mM EDTA. 10mg/ml ascorbate dans le même tampon (à préparer juste avant le dosage). Pour le dosage, mélanger 40ml du tampon phosphate avec 80µl d'une solution d'ascorbate (à préparer juste avant le dosage = tp+asc).

Extraction : Prélever 2 spatules de poudre et extraire dans 400µl tampon phosphate dans glace. Vortexer puis centrifuger pendant 15 min à 4°C. Prélever le surnageant pour dosage immédiat.

Dosage : La mesure colorimétrique est effectuée à 265nm à l'aide d'un Spectrophotomètre (Shimadzu, Japon) à 4 cuves, la cuve de référence contenant tp+asc. Enregistrer la pente initiale sans l'échantillon dans un tube contenant 1.8ml du mélange tp+asc. Ajouter 200µl d'extrait et mesurer la pente finale.

Extraction des enzymes liés au métabolisme des sucres

D'après Gibon et al., 2004.

Tampon d'extraction :

Glycérol 10%, BSA 0.1%, Triton X100, 50mM Hepes/KOH pH7,5, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA); 1mM benzamidine, 1mM acide aminocapronique, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10mM leupeptine et 1mM DTT.

Extraction :

20mg de poudre fraîche a été aliquoté et l'extraction dans 500µl de tampon se fait au vortex. Le surnageant est prélevé et des dilutions peuvent être réalisées en fonction des activités de enzymes. L'ensemble de l'extraction se déroule dans un environnement froid (4°C).

Estimation de l'activité de l'enzyme Invertase acide (AI)

D'après Gibon et al., 2004.

Tampons et solutions à préparer :

Mix 1: Acetate/KOH 0.25M pH5 + sucrose 100mM + TritonX100 0.15%

Mix 2: Hepes/KOH 1M pH7 + MgCl₂ 30mM + eau (dilution 1/10).

ATP 100mM ; NADP⁺ 20mM ; G₆PDH grade II 50unit.ml⁻¹ (dans 200mM Tricine/KOH pH8, 10mM MgCl₂)

Dosage :

Dans une microplaque, ajouter 45µl de M1 + 5µl d'extrait à doser. Agiter. Incuber pendant 5 et 40 min (deux plaques différentes) à 25°C. Puis ajouter 30µl Imidazole 4M pH7.6. Agiter. Incuber pendant 10min à 98°C. Puis ajouter le M2 + 480µl ATP 100mM + 480µl NADP⁺ 20mM + 80µl G₆PDH. Agiter et lire l'absorbance à 340nm jusqu'à obtention d'un plateau. Ajouter 1µl Hexokinase et 1µl de Phosphoglucose isomerase par puit.

Estimation de l'activité de l'enzyme Invertase neutre (NI)

D'après Gibon et al., 2004.

Tampons et solutions à préparer :

Mix 1: 5µl Hepes/KOH 1M pH7.5 + 0.2µl MgCl₂ 1M + 2µl ATP 100mM + 2µl NADP⁺ 20mM + 83µl eau + 1µl mix enzyme (G₆PDH/PGI/HK à 1:1:1).

ATP 100mM ; NADP⁺ 20mM ; G₆PDH grade II 50unit.ml⁻¹ (dans 200mM Tricine/KOH pH8, 10mM MgCl₂) ; Sucrose 1M

Dosage :

Dans une microplaque, ajouter 95µl de M1 + 5µl d'extrait à doser. Agiter et lire l'absorbance à 340nm jusqu'à obtention d'un plateau.

Estimation de l'activité de l'enzyme Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G₆PDH)

Principe : L'activité G₆PDH est estimée par le dosage du NADPH par « cycling assay », permettant de générer le produit dosé par une réaction en boucle. D'après Gibon et al., 2004.

Tampons et solutions à préparer :

Mix 1: Tricine/KOH 200mM pH8 + MgCl₂ 50mM + TritonX100 0.25%.

Mix 2: 18.5µl eau + 10µl Tricine/KOH 100mM pH9 + 10µl MTT 10mM + 4µl EDTA 200mM + 2µl G6P 250mM + 0.5µl G₆PDH grade II 50unit.ml⁻¹ (dans 200mM Tricine/KOH pH8, 10mM MgCl₂).

NaOH 0.5M; HCl 0.5M.

Dosage : Dans une microplaque, ajouter 18µl du Mix 1 + 2µl d'extrait. Agiter et incubé pendant 20min à 25°C. Ajouter NaOH 0.5M. Agiter et incubé pendant 5min à 95°C. Puis ajouter 20µl HCL 0.5M (dans 100mM Tricine/KOH pH9). Agiter puis ajouter Mix 2 + catalyste PES 4mM. Lire l'absorbance à 570nm.

Détection et dosage du radical MDHA

Principe :

Le radical MDHA est une espèce paramagnétique possédant un électron non apparié. La détection des espèces paramagnétiques peut être effectuée par la spectrométrie de Résonance Paramagnétique Electronique, ou RPE. Elle repose sur l'absorption de radiations par les électrons non appariés lorsque l'on expose la molécule à un champ magnétique.

Le champ magnétique va dépolariser l'électron non apparié et provoquer un basculement de sa rotation de 180°. L'électron va alors retourner à l'état initial et absorber de l'énergie qui sera captée par la RPE et traduit en un spectre caractéristique du MDHA. D'après Buettner et Jurkiewicz, 1993.

Réglage de l'appareil :

L'acquisition des spectres RPE a été réalisée sur un appareil Miniscope MS300 Magnettech équipé d'une lampe UV. Les paramètres d'acquisition utilisés sont : puissance, 10 mW; amplitude modulation, 2G ; gains, 900; temps d'acquisition, 12 secondes et la fenêtre de champ, 3349.06G.

Quantification de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes

Principe : Le dosage s'effectue par mesure colorimétrique.

Extraction et dosage : Prélever 100mg de poudre fraîche par échantillon et peser la masse exacte. L'extraction est réalisée en ajoutant 1 ml d'acétone dans chaque tube. Incuber pendant 15 min dans la glace en agitant de temps en temps jusqu'à décoloration complète de la poudre. Centrifuger pendant 5 min.

Prélever le surnageant et doser à l'aide d'un spectrophotomètre à 662 nm, 645 nm et 470 nm. Les teneurs en chlorophylle a, chlorophylle b et en caroténoïdes sont évaluées selon les calculs suivants :

$$[\text{Chl a}] = (11.24 \times A_{662}) - (2.04 \times A_{645})$$

$$[\text{Chl b}] = (20.13 \times A_{645}) - (4.19 \times A_{662})$$

$$[\text{Caroténoïdes}] = \frac{(1000 \times A_{470} - 1.9 \times [\text{Chl a}] - 63.14 \times [\text{Chl b}])}{214}$$

Les teneurs sont exprimées en µg/g de matière fraîche.

Méthode d'identification des produits de dégradation de la vitamine C dans les fruits et les feuilles de tomate

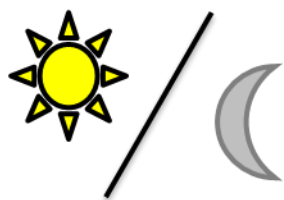
Manipulation de [^{14}C]-ascorbate

Principe : Le métabolisme et le catabolisme d'une molécule d'ascorbate marquée sur le carbone 1 sont étudiés par électrophorèse à haut voltage (HVPE). La séparation des dérivés d'ascorbate est réalisée par électrophorèse, puis une quantification par analyse de la radioactivité est effectuée.

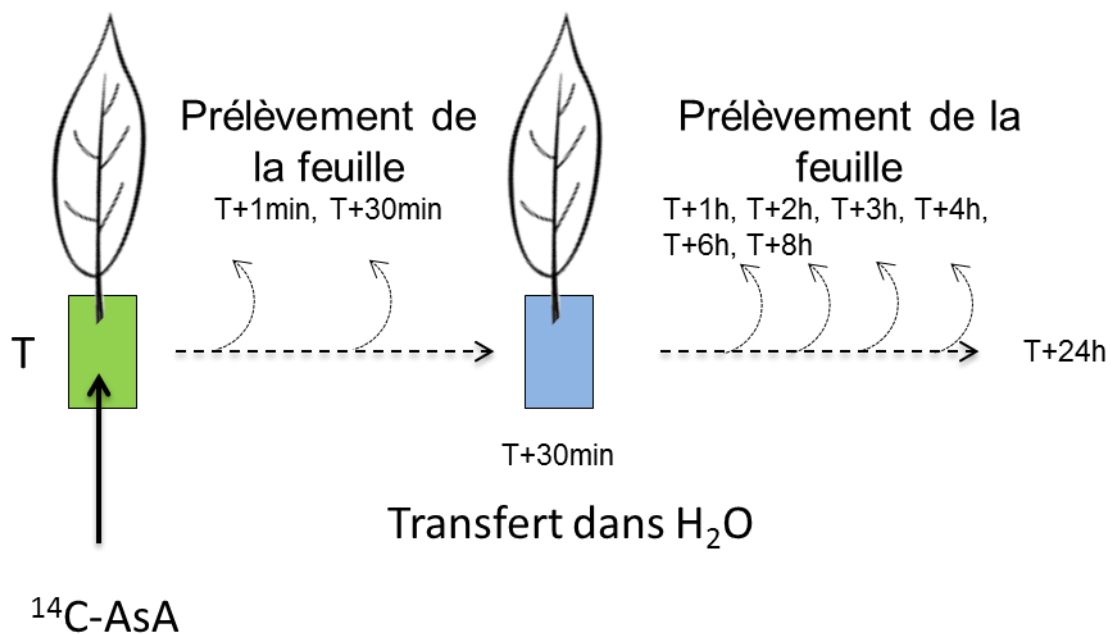
Incubation et extraction :

Des jeunes feuilles en croissance sont délicatement prélevées à l'aide d'un scalpel et immédiatement transférées dans un bécher contenant de l'eau (le pétiole est placé au contact de l'eau pour éviter toute embolie gazeuse dans les tissus vasculaires). Sous environnement contrôlé (faible intensité lumineuse ($4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou totale obscurité; renouvellement constant d'air à l'aide d'une hotte aspirante permettant d'augmenter la transpiration des feuilles), les feuilles sont transférées dans un tube de 0.5ml coupé contenant 20 μl de [^{14}C]-ascorbate (L-[1- ^{14}C] ascorbic acid (0.52 or $0.407 \text{ MBq}.\mu\text{mol}^{-1}$) provenant de GE Healthcare, UK) pendant 30 min environ (le temps pour la feuille d'absorber la totalité des 20 μl). Chaque feuille est ensuite placée dans un tube contenant de l'eau pour le reste de l'expérimentation. Des prélèvements de feuilles sont réalisés en cinétique afin de suivre l'absorption et le métabolisme de l'ascorbate après 1 min d'incubation, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h et 24h. La feuille est rapidement congelée à -80°C .

Des péricarpes de fruits au stade immature green et stade rouge sont prélevés et placés dans un milieu contenant du [^{14}C]-ascorbate et un mélange 2mM KCl : 0.5mM CaCl_2 . Des prélèvements de péricarpe sont réalisés en cinétique afin de suivre l'absorption et le métabolisme de l'ascorbate après 1 min d'incubation, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h et 24h. Le péricarpe est rapidement congelé à -80°C . Le matériel végétal (fruit ou feuille) est pesé puis broyé dans l'azote liquide. L'extraction des produits marqués dérivés de l'ascorbate se déroule en trois étapes : (i) la poudre fraîche est homogénéisée dans 150 μl 15% acide formique et le surnageant est conservé à -80°C pour une analyse en HVPE (ii) le culot obtenu est rincé et un traitement avec 1M NaOH est effectué, la moitié du surnageant est conservé pour une scintillation future (iii) tandis que l'autre moitié subit une dialyse (dans des tubes Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)) pour piéger les polymères puis une scintillation. Enfin (iiii) le culot obtenu est homogénéisé dans 2M TFA (trifluoroacétique acide) et le TFA est évaporé au speed-vac avant une analyse en HVPE et une scintillation. La **figure 17** résume ce protocole.



a)



b)

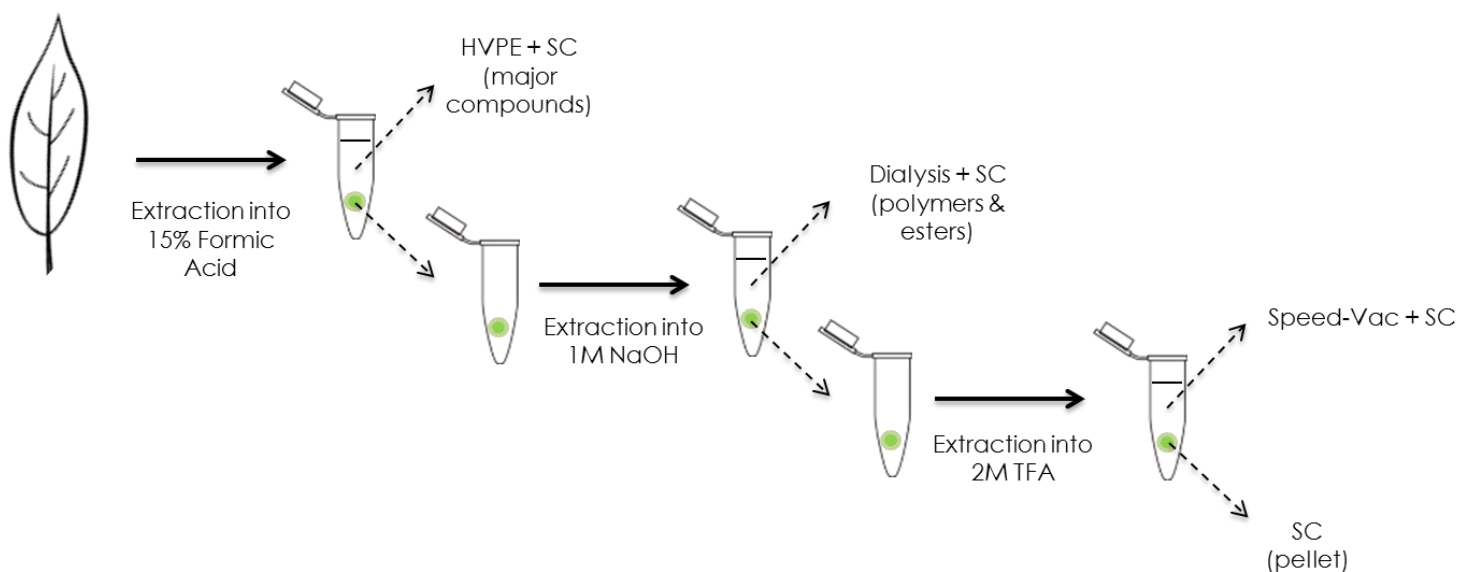


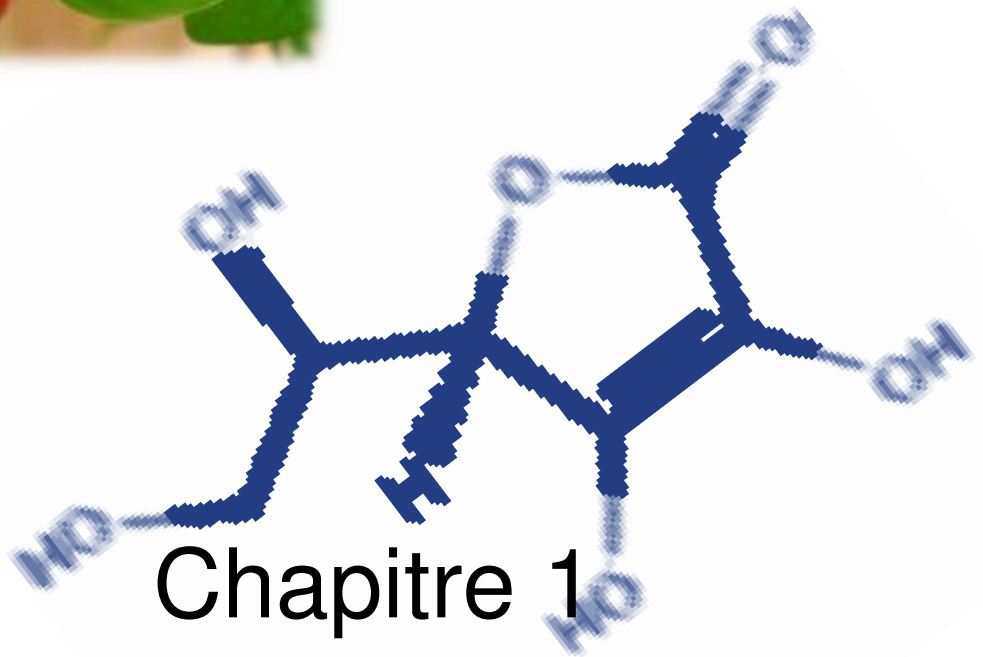
Figure 17 : Protocole d'analyse des produits de dégradation de l'ascorbate par marquage radioactif. a) incubation de l'ascorbate radioactif dans la feuille b) extractions, séparation des molécules par HVPE et quantification de la radioactivité par scintillation (SC). Méthode utilisée lors de mon séjour au sein du laboratoire ECWG à Edimbourg.

HVPE :

10µl de chaque échantillon (ainsi qu'un standard interne Orange G) sont déposés sur un papier Whatman No.3 et une électrophorèse est réalisée (i) à pH6.5 dans un milieu acide acétique-pyridine-eau (1:33:300), contenant 5mM EDTA pendant 30 min à 3kV ou (ii) à pH2.0 dans un milieu acide formique-acide acétique-eau (1:35:355) pendant 1h à 3kV. Durant l'analyse, le papier est refroidi à 20-25°C par un flux de toluène (pH6.5) ou de white spirit (pH2.0).

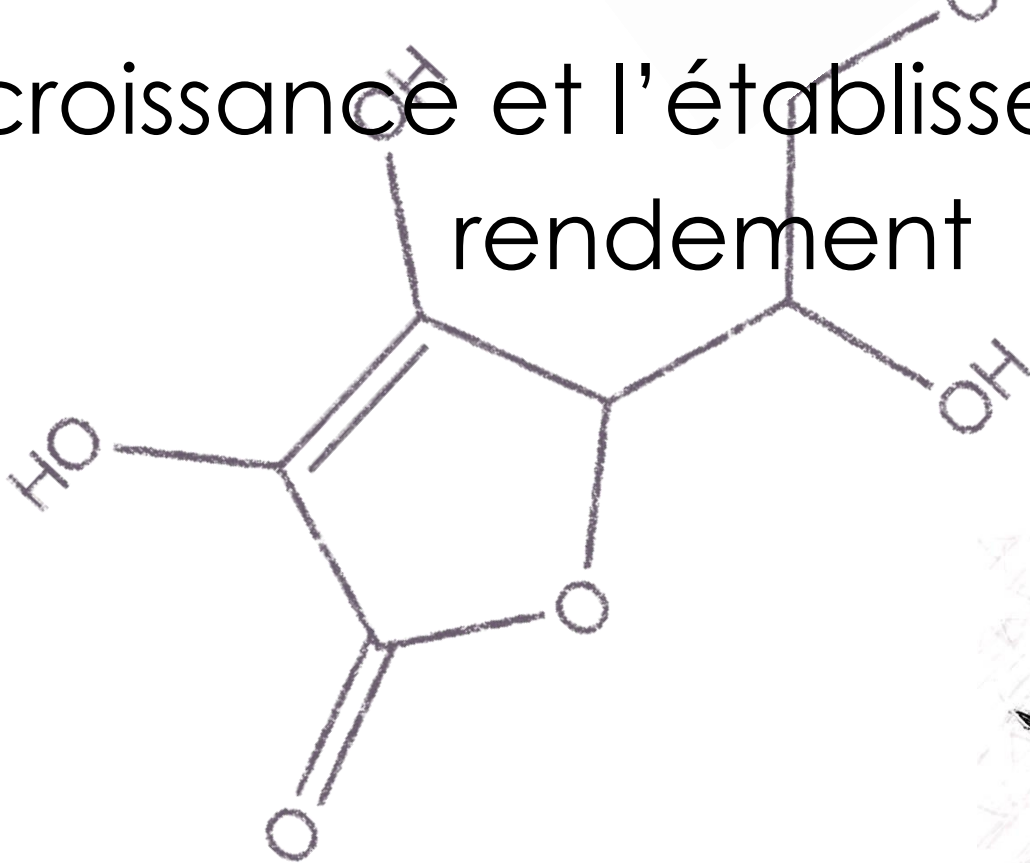
Autoradiographie et scintillation :

Un film photographique (x-ray film Kodak BioMax MR-1) est mis en contact avec le papier et 0.5µl d'encre radioactive pendant 3 mois à l'obscurité. La radioactivité est révélée par autoradiographie. Le papier est ensuite coupé en petits morceaux et placé dans un tube Packard de 20ml en plastique contenant 2 ml de liquide de scintillation pour papier (Gold Star scintillant). Les surnageants contenant de la radioactivité sont homogénéisés dans le liquide de scintillation pour liquide (OptiScint HighSafe' ; 10x le volume d'échantillon). La radioactivité est quantifiée par scintillation (LS 6500 Beckman; Beckman Coulter Ltd, High Wycombe, UK).



Chapitre 1

De l'importance du recyclage
de l'ascorbate dans la
croissance et l'établissement du
rendement



Avant-propos

Ce chapitre s'articule autour des relations entre le recyclage de l'ascorbate et les processus intervenant dans la division et la croissance cellulaire des organes végétatifs et des fruits chez la tomate. Cette relation peut entraîner des répercussions sur l'établissement du rendement de la plante et sera discutée dans ce chapitre.

Précédemment à mon arrivée au sein du laboratoire, des lignées de tomate cerise présentant une activité de recyclage de l'ascorbate modifiée ont été générées en sur-exprimant ou sous-exprimant l'enzyme MDHAR ou l'enzyme AO. L'objectif de ce chapitre est d'analyser les mécanismes métaboliques et physiologiques mis en place par la plante pour compenser cette modification de l'activité du recyclage de l'ascorbate, en situation de culture normale mais également lors de situations pouvant engendrer un stress carboné, lumineux ou oxydatif. Nous avons étudié l'impact d'une modification soudaine de l'intensité lumineuse sur des jeunes plantules de tomate afin de mieux contrôler l'environnement lumineux perçu par les feuilles (en prenant soin d'éviter tout auto-ombrage par les feuilles des étages supérieurs), ce qui aurait été délicat à réaliser avec des plantes entières. Nous avons également manipulé le ratio source-puit sur des plantes matures portant des fruits.

Ce travail est réalisé en collaboration avec l'INRA de Bordeaux (Yves Gibon et Duyen Prodhomme) et le Max Planck Institute de Golm (Alisdair Fernie et Alexandra Florian). Une partie des expérimentations a été réalisé au CEA de Cadarache (Michél Péan).

Cet article a été soumis au journal Plant, Cell and Environment.

Reduction of MDHAR activity in cherry tomato suppresses growth and yield and MDHAR activity is correlated with sugar levels under high light

Vincent Truffault^{1, 2}, Noé Gest¹, Cécile Garchery¹, Alexandra Florian³, Alisdair R. Fernie³, Hélène Gautier² and Rebecca Stevens¹

¹ INRA, UR-1052, Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, CS60094, 84143 Montfavet, France

² INRA, UR-1115, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, CS40509, 84914 Avignon Cedex 9, France

³ Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Am Muehlenberg 1, 14476 Potsdam-Golm, Germany

Abstract:

Ascorbate is oxidized into the radical monodehydroascorbate (MDHA) through ascorbate oxidase or peroxidase activity or non-enzymatically by reactive oxygen species. Regeneration of ascorbate from MDHA is ensured by the enzyme monodehydroascorbate reductase (MDHAR). Previous work has shown that growth processes and yield can be altered by modifying the activity of enzymes that recycle ascorbate, therefore we have studied similar processes in cherry tomato (*Solanum lycopersium* L.) under- or overexpressing MDHAR. Physiological and metabolic characterization of these lines was carried out under different light conditions or by manipulating the source-sink ratio. Independently of the light regime, slower early growth of all organs was observed in MDHAR silenced lines, decreasing final fruit yield. Stomatal conductance and photosynthesis were altered as was the accumulation of hexoses and sucrose in a light-dependent manner in plantlets. Sucrose accumulation was also repressed in young fruits and final yield of MDHAR silenced lines showed a stronger decrease under carbon limitation. Ascorbate and monodehydroascorbate appear to be involved in the control of growth and sugar metabolism in cherry tomato and these enzymes could be potential targets for yield improvement.

Keywords: ascorbate recycling, carbon limitation, growth, monodehydroascorbate, redox status, oxidative stress, *Solanum lycopersicum*, yield.

Ascorbate is a small organic acid derived from sugars. In plants, ascorbate is a key molecule involved in numerous cellular processes such as cell division and expansion, photo-protection, as an enzyme cofactor and in cell signaling (Smirnoff et Wheeler, 2000). Ascorbate is a powerful antioxidant in plants which requires rapid and efficient recycling of the oxidized forms (monodehydroascorbate and dehydroascorbate). Indeed it is considered to be an ideal cellular antioxidant (Arrigoni et De Tullio, 2002; Gest et al. 2013b). Ascorbate is present in high concentrations in all cell types and can interact with a large range of oxidant species (notably reactive oxygen species). Reactive oxygen species (ROS) act as signals for plants facing stress (Mittler, 2002). In the case of severe stress (Sharma et al., 2012), the concentration of ROS exceeds the capacity of the antioxidant system to limit their production and damage can occur including degradation of cell walls, changes in ion transport, decrease in enzyme activity, inhibition of protein synthesis, DNA degradation and cell death. Ascorbate content is increased in organs and cells affected by oxidative stress caused by a wide range of stresses including chilling, salinity, drought, heavy metals and high light (Davey et al., 2000; Gautier et al., 2010; Stevens et al., 2008; Szarka et al., 2012), which may help the plant to counteract these negative effects.

The reduced form of ascorbate (AsA) is oxidized into monodehydroascorbate (a radical; MDHA), resulting from the loss of a single electron. The enzyme ascorbate oxidase oxidizes ascorbate into monodehydroascorbate in the apoplast, and also in the endoplasmic reticulum (Csala et al., 1999). Dehydroascorbate (DHA) is generated from the disproportionation of the radical MDHA or the loss of a second electron from MDHA. The recycling pathway controls the redox state of the ascorbate pool and is especially important during stress responses; recycling occurs via the two enzymes monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR). MDHAR is a NADPH-dependent enzyme which can reduce MDHA into AsA, but can also reduce phenoxyl radicals (Sakihama et al., 2002) and is considered the predominant recycling activity under high light in tomato fruit (Poiroux-Gonord et al., 2013). DHAR uses glutathione as an electron donor to reduce DHA into AsA. Ascorbate recycling ensures a relatively high turnover rate of the ascorbate pool, estimated at approximately 13% per hour in pea seedlings (Pallanca et Smirnoff, 2000).

The ascorbate pool and ascorbate metabolism have a crucial role in plant growth. Plants lacking the ability to synthesize ascorbate showed no development beyond the seedling stage (Dowdle et al., 2007). As growth is related to cell division and cell expansion, a large number of studies have mentioned that ascorbate metabolism is closely linked to these processes: ascorbate stimulates mitosis via the G1 to S phase transition (Liso et al., 1984); (Pinto et al., 1999), unlike DHA which is an inhibitor of the G1 phase (Potters et al.,

2004). The impact of the oxidized forms MDHA and DHA on cell expansion is also widely studied (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Smirnov, 1996). The AsA/DHA ratio could be a signal controlling the transition from cell division to cell expansion: DHA is correlated with inhibition of cell expansion processes in onion (Gonzalez-Reyes et al., 1995) whereas MDHA stimulates expansion. Ascorbate oxidase could be involved in this transition (Kato et Esaka, 2000), and is highly interesting due to its close link with the growth related hormone auxin (Kerk et al., 2000). Ascorbate oxidase plays a role in the regulation of auxin in mitotic areas, and oxidatively decarboxylates auxin *in vitro*. Over-expression of ascorbate oxidase results in a lower ascorbate redox state in tobacco (Fotopoulos et al., 2006; Sanmartin et al., 2003), through possible accumulation of MDHA. Furthermore, MDHA is involved in cell wall loosening (Schopfer et al., 2002) and vacuole enlargement (Smirnov and Wheeler, 2000). Cytochrome b561, localized in cell walls, has also been shown to have MDHAR activity and can reduce the MDHA radical. This reduction leads to transport of electrons across the cell wall and thus to redox modifications which should allow cell wall expansion (Asard et al., 2013; Horemans et al., 2000, 1994). The AsA/DHA couple redox status is not involved (Kato et Esaka, 1999). Ascorbate could also act as pro-oxidant, via the accumulation of hydroxyl radicals and H₂O₂, notably in the apoplastic cell wall (Fry, 1998). The hydroxyl radical is potentially able to provoke non-enzymatic scission of cell wall polysaccharides, increasing cell wall loosening. These studies thus collectively highlight the essential role of ascorbate in various growth processes.

Some links have already been made between enzymes involved in adjusting the ascorbate redox state and yield or physiological processes in crops. For example, Garchery et al. (2013) have shown that silencing ascorbate oxidase activity improved yield in non-optimal growing conditions, with effects on sugar metabolism. Furthermore, Kim et al. (2013) have shown that over-expression of DHAR (with a co-activation of other antioxidant enzymes, which includes an increase of 1.4-fold in MDHAR activity compared to the wild type) improves rice yield, probably linked to the enhancement of photosynthetic capacity. We hypothesized that MDHAR could also have effects on growth and yield, given this information and considering that ascorbate metabolism, notably the first oxidation of ascorbate into MDHA, and growing processes appear to be closely linked. We therefore investigated the impact of modifying the expression of a peroxisomal and cytosolic isoform of MDHAR (MDHAR3; Gest et al., 2013a) on growth, yield and physiology of cherry tomato plants. Global modifications to the metabolome and also the phenotype of transgenic lines will be discussed. Conditions of carbon limitation, low or high light were also used to test the behaviour of these lines under these conditions where reserves are limited.

Materials and methods

Plant material:

Solanum lycopersicum L. variety West Virginia 106 (cherry tomato) cotyledons were transformed as previously described by Gest et al., 2013a. In the present study, lines overexpressing MDHAR3 were labelled MDHAR overexpressing lines (sx1.7 and sx6.10 and are used as independent lines homozygous for the transgene, previously called md1.7 and md6.10 in Gest et al., 2013a). The independent lines under-expressing MDHAR3 used in this paper were mds3, mds5 and mds42 (and labelled MDHAR silenced lines). Wild type plants were used as reference (WT). These lines have previously been characterized in terms of MDHAR activity in Gest et al., 2013a except for mds42 which was not used and has been used here; the decrease in MDHAR activity of this line compared to the wild type is shown in **Supplemental Table S1** along with the unpublished gene expression data.

Growth conditions and experimental design:

Climatic chambers for light intensity experiment on plantlets

Tomato seedlings were sown in a sand and perlite mixture and then plantlets were grown in climatic chambers under low light conditions ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and watered every day with nutrient solution (pH5.8, 1.15mS, Plantin® Liquoplant Rose, France). After 2 weeks, half of the plantlets were placed under high light conditions ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) for 7 days while the other half remained under low light for 7 days. Tomato plantlets were grown under short-days (i.e. 8h light/16h dark) for the whole experiment. Samples were harvested before the start of the light treatment (T), and then after 1h, 3h and 6h. The final time point was harvested after 7 days (at midday). Six plantlets per genotype and per condition were harvested at each time point.

In an independent experiment (shown in **Figure 4c**), plantlets were grown under normal growth conditions at $380 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and $25^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ (day/night cycle) or under conditions of photooxidative stress at $1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and $12^{\circ}\text{C}/10^{\circ}\text{C}$ (day/night cycle) and harvested after 15 days of treatment for further analyses. Six plantlets per genotype and per condition were used as replicates.

Greenhouse for normal growth and conditions of carbon limitation on mature plants

In the greenhouse experiments under normal conditions, tomato plants were grown in a multi-span Venlo-type greenhouse in 5l pots (potting compost P3 Tref, Tref EGO substrates BV). Water and nutrients were supplied to the plants using a drip irrigation system to maintain 20-30% drainage. Light intensities of 300-700 photosynthetically active radiation were obtained over the culture period. Flowers were mechanically pollinated three times a week and side shoots removed as they appeared. To put the plants under conditions of

carbon limitation, only 1 leaf was retained per truss with other leaves being removed (equivalent to removing 2 out of 3 leaves). This treatment was carried out after all fruits from the truss number five had set. Fruit yield was estimated by counting the number of fruit per truss and weighing the fruits for the first 6 trusses. Fruits of the following developmental ages: 20 days after anthesis, mature green, orange and red were harvested and immediately frozen and stored at -80°C before grinding.

Photosynthesis and stomatal conductance measurements:

Stomatal conductance and net CO₂ assimilation rates were measured using a LI-6400XT (LI-COR Biosciences) with the following parameters: 25°C, 1000 or 100 µmol.m⁻².s⁻¹, 600 ppm CO₂, 60% of relative humidity, air flow of 500ml.s⁻¹. Measurements of photosynthetic activity (µmol CO₂.m⁻².s⁻¹) and stomatal conductance (µmol H₂O.m⁻².s⁻¹) were performed on the 5th leaf of 6 plantlets per genotype at dawn and in the afternoon of the first day in the two chambers of the light intensity experiment and then once per day at noon.

Fluorescence measurements:

The ratio of variable to maximum fluorescence (Fv/Fm) was calculated using a portable Fluorescence Monitoring System (FMS 1, Hansatech®, Kings Lynn, Norfolk, UK) with leaf clips for adapting leaves to darkness. After 30 min of dark adaptation, the Fv/Fm of tomato leaves was evaluated by measurements of the maximal potential efficiency of excitation capture by photosystem II (PSII). 0.85 is the optimum; a decrease in Fv/Fm indicates photo-inhibition of PSII. Measurements were performed every hour on six tomato leaves per genotype during the first day of light treatments in the two chambers, and then once per day at noon.

Plant analyses:

Fresh mass and dry mass (g) of six plantlets per genotype were recorded just before the start of light treatment (T) and after 7 days (still at the end of the night), by separating roots, leaves and stems. The dry weight of the material was estimated after drying for 3 days at 72°C. Leaf area (cm²) and stem length (cm) were estimated from photographs taken of the same plantlets (ImageJ software, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). In an *in vitro* experiment on ½ MS culture medium containing no sugar (Medium) or 0.5% (w/v) glucose and 0.5% (w/v) fructose (M+ Glc + Fru) or 0.5% (w/v) sucrose (M+ Sucrose), root lengths of 38-day-old plantlets were taken by measuring the length of the primary root once the plantlet was removed from the medium.

Measurement of fruit growth rate and final diameter

Fruit expansion was measured twice weekly using electronic calipers from 10 days after anthesis throughout the ripening period on 6 fruits per plant with a minimum of 3 plants per line.

Measurement of pericarp cell size and cell number

Fruits harvested 3 days after anthesis were measured with an electronic sliding scale before being immersed in a cold fixative (formalin-acetic acid-alcohol at 1:1:8 v/v/v) for 48h at 4°C. Fruits were then rinsed in distilled water, dehydrated in alcohol (25-50-70-85 and 100%) and embedded in resin (Kit Technovit 7100 Werheim, Germany). 5µm thickness cross sections were obtained using a Leica Microtome (Reichert-Jung Leica instruments, Nussloch, Germany), fixed on microscope slides and stained by adding 0.5% toluidine blue. The photographic images were captured using a Leica automatic camera and images were analyzed with ImageJ software. The number of cells in a given area was counted. Data are means from 5 sections per fruit from 5 fruits per genotype.

Extraction of metabolites, derivatization and analysis using GC-MS:

Tomato leaves were ground to powder in liquid nitrogen. Extraction was performed in 1000µl of previously degassed cold methanol with 120µl of internal standard ribitol (0.2mg.ml⁻¹ in water). The mixture was extracted for 20 min at 4°C, and then mixed vigorously with 400µl of water. After centrifugation at 15300g, the supernatant was reduced to dryness in a Speed-Vac. Samples were immediately analyzed or stored for a maximum of 48h at -80°C. Dry residues were re-dissolved in 60µl of methoxyamine (20mg.ml⁻¹ in pyridine) and derivatized for 90min at 37°C. A 30 min treatment at 37°C with 120µl of MSTFA (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) was performed. 8µl of retention time standards (a mixture of dodecane, pentadecane, nonadecane, docosane) were added before trimethylsilylation. Samples were then loaded onto the AI 3000 autosampler (Thermo Scientific, France). Sample volumes of 1µl were injected into the GC column using a hot needle technique. Analyses were carried out with a Trace GC Ultra-ISQ GC-MS system (Thermo Scientific, France). Gas chromatography was performed on a Thermo TR-5MS column (20m length x 0.10mm inner diameter x 0.10µm film thickness). The injection temperature was set at 230°C and the ion source to 200°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.4ml.min⁻¹. The following temperature schedule was set: 3.70 min isothermal heating at 70°C, followed by a 7°C.min⁻¹ ramp to reach 280°C and a second ramp of 30°C/min to 320°C for a final heating of 1 min. Mass spectra were recorded at 6.6 scans.s⁻¹ with an *m/z* 50-650 scanning range. Mass spectra were cross-referenced with those in the Golm Metabolome Database (Kopka et al., 2005).

Relative concentrations were determined by comparison with a ribitol internal standard. Information on metabolites analyzed during experiments in this paper are provided in **Supporting Information Table S2**.

For the high light and low temperature experiment, metabolome analysis was performed at Max Planck Institute of Golm. Extraction and derivatization was performed as described above, and then samples were loaded onto the CTC Combi PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Sample volumes of 1 µl were injected into the GC column (30m MDN-35 column, Machery-Nagel, Düren, Germany) using a hot needle technique. Analyses were carried out with a system consisting of a 6890N Agilent GC and a TOF-MS Pegasus III (Leco Instruments, St. Joseph, USA). The injection temperature was set at 230°C and the ion source to 250°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 2 ml.s⁻¹. The following temperature schedule was set: 2 min isothermal heating at 85°C, followed by a 15°C.min⁻¹ ramp to reach 360°C. Mass spectra were recorded at 20 scans.s⁻¹ with an *m/z* 70-600 scanning range.

Sugar assay

Measurements of glucose, fructose and sucrose were performed by HPLC, as previously described (Gomez et al., 2002). Sugars were extracted in a methanol:chloroform:water mixture (1/0.6/1) at 4°C. Polyvinylpyrrolidone was used to trap phenolic compounds and extracts were then purified through Waters C18 cartridge (Waters) and 0.45 µm Sep-Pak filter (Jasco France) before quantitative analysis.

Assay of enzymes involved in sugar metabolism

Measurement of G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase), acid invertase and neutral invertase activities were carried out on leaves as previously described (Gibon et al., 2004).

Statistical analysis:

Data were submitted to a three way analysis of variance (ANOVA) by taking into account the effects of the genotype, environment and time and their interactions using XLStat software (Addinsoft, France). Significant differences between treatments were assessed by a Fisher's test (one star for $p < 0.05$ and two stars for $p < 0.01$). MeV (MultiExperiment Viewer, version 4.9) software was used to produce heat maps.

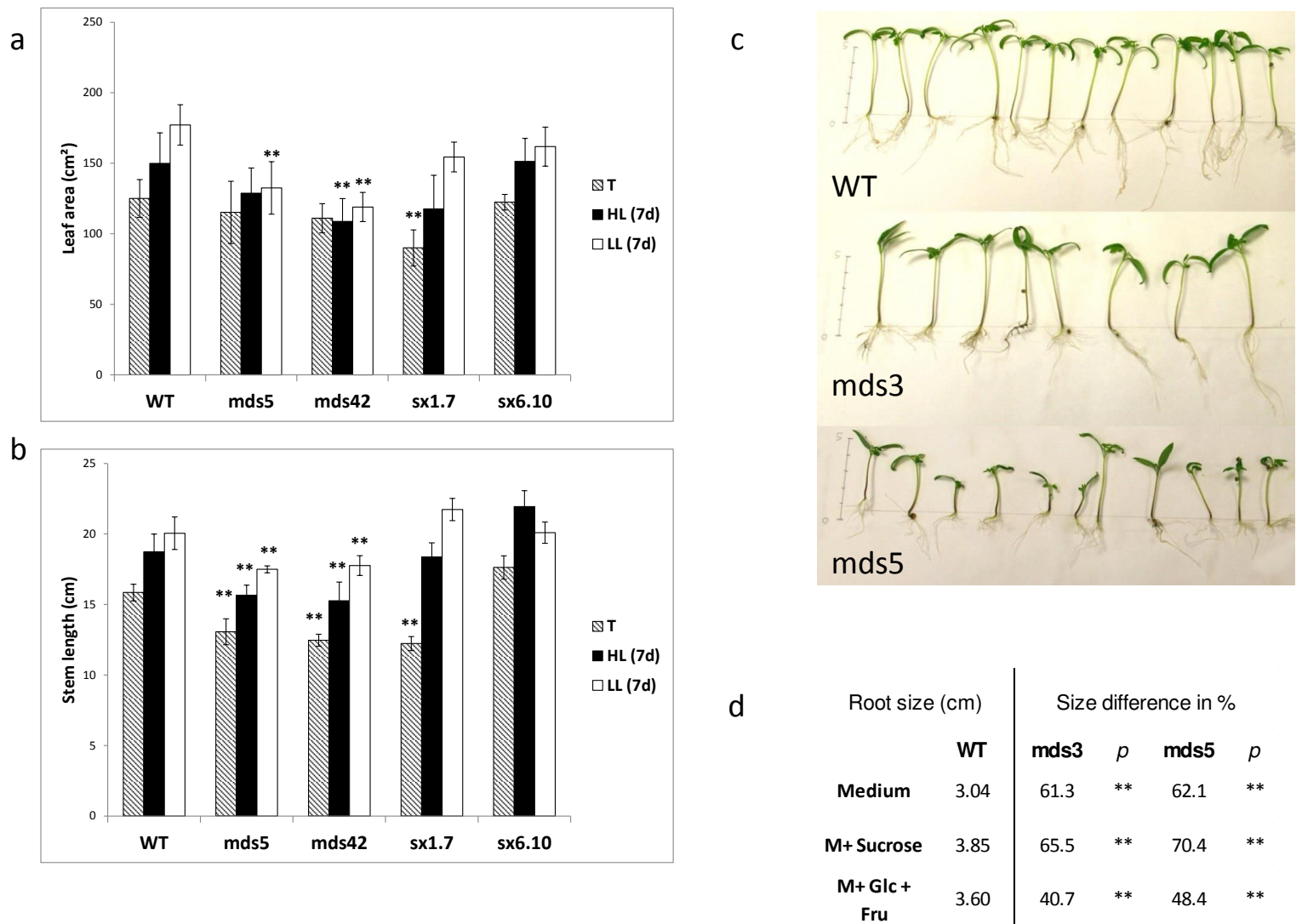


Figure 1: Growth phenotypes of MDHAR silenced lines, MDHAR overexpressed lines and wild type (WT).

(a) Leaf area of 21-day-old plantlets expressed in cm², all leaves from the plant were photographed, scanned and analyzed with ImageJ software. Data are means from 6 plants per genotype harvested before the transition (T, hatched bars) or after 7 days under high light (1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, black bars) or low light (100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, white bars). Error bars represent standard deviation.

(b) Stem length expressed in cm. Data obtained as described in part (a).

(c) Pictures of MDHAR silenced lines and wild type plantlets aged 14 days after germination *in vitro* culture ($\frac{1}{2}$ MS medium) under fluorescent light (photoperiod 16h/24h).

(d) Root length of 38-day-old plantlets grown on $\frac{1}{2}$ MS culture medium containing no sugar (Medium) or 0.5% (w/v) glucose and 0.5% (w/v) fructose (M+ Glc + Fru) or 0.5% (w/v) sucrose (M+ Sucrose). Data are means from at least 35 replicates per genotype and treatment.

(a, b, d) Two stars indicate significant difference with the wild type ($p < 0.01$).

Results

Diminution of MDHAR activity retards growth

Wild type and MDHAR overexpressing (sx1.7 and sx6.10 lines) or silenced lines (mds5 and mds42) were acclimated to low light conditions before being transferred to high light, or being left under low light conditions. Leaf area and stem length of lines were measured before the transition (T) and after 7 days of growth under the two different light regimes. Complete statistical analysis is available in **Supporting Information Table S3**. No statistical difference in leaf area between the lines was observed before the change in light treatments (**Figure 1 a**) with the exception of line sx1.7 which displayed a decrease. After 7 days under high light, plantlets showed no significant growth as a similar leaf area compared to T was observed. After 7 days of growth, mds42 showed a significantly reduced leaf area which was independent of the light regime, whereas mds5 showed a reduced leaf area only under low light. Indeed, MDHAR silenced plantlets showed no increase in leaf area under either condition compared to T, in contrast to overexpressing and wild type lines. Stem length (**Figure 1**) increased after 7 days under high or low light for all lines. The stem length of MDHAR silenced lines was particularly reduced from the beginning of the experiment resulting in smaller plantlets in terms of height compared to other lines. Plantlets of MDHAR silenced lines had therefore grown more slowly in height during the 7 days of treatment compared to wild type and MDHAR overexpressed lines.

Independent *in vitro* experiments on MDHAR silenced lines from 5 to 25 days post-germination (**Figure 1 c and d**) showed that root size was also affected by MDHAR silencing. Indeed, in the two independent MDHAR silenced lines, average root length was reduced to 61% (mds3) or 62 % (mds5) of wild type root size. We noted that the wild type phenotype could be partially restored by increasing hexose availability in the growth medium. Plantlets were grown in a medium containing both 0.5% (w/v) glucose and 0.5% (w/v) fructose or in 0.5% (w/v) sucrose. In the case of mds3 plantlets, the difference with WT is decreased to 40% when glucose and fructose are present in the culture medium (**Figure 1 d**). The same effect is observed for mds5 plantlets, where the presence of glucose and fructose decreases the root length difference with the wild type from 62% to 48%. However, no effect of sucrose in the medium was detected on the root length of MDHAR silenced lines.

Total biomass distribution between leaves, stems and roots was evaluated at time T and at the end of the experiment (**Supporting Information Table S4**). Results from Table 1 are expressed as the ratio between fresh or dry weight at T and following 7 days of high light or low light treatment. Total fresh weight (leaves, stems and roots) increased under high light (**Table 1 a**) and a lower increase in terms of fresh weight appears under low light.

Table 1: (a) Total fresh weight and (b) total dry weight of leaves, stems and roots for wild type genotype, MDHAR silenced lines and MDHAR overexpressing lines. Results are expressed in ratio of weights after 7 days of light treatment compared to time T, before treatment starts. One star indicates significant differences with the WT ($p < 0.05$), two stars ($p < 0.01$).

(a)

		Fw (ratio 7d treatment / initial)								
		WT	mds5	<i>p</i>	mds42	<i>p</i>	sx1.7	<i>p</i>	sx6.10	<i>p</i>
Leaves	<i>high light</i>	2.7	2.4	<i>ns</i>	2.0	**	2.7	<i>ns</i>	2.6	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	1.5	1.3	<i>ns</i>	1.3	<i>ns</i>	1.7	<i>ns</i>	1.5	<i>ns</i>
Stems	<i>high light</i>	1.7	1.6	<i>ns</i>	1.5	*	2.3	<i>ns</i>	1.7	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	1.3	1.3	<i>ns</i>	1.2	<i>ns</i>	1.8	<i>ns</i>	1.2	<i>ns</i>
Roots	<i>high light</i>	3.8	3.2	<i>ns</i>	2.6	**	4.1	<i>ns</i>	3.3	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	1.6	1.2	<i>ns</i>	1.4	<i>ns</i>	1.9	<i>ns</i>	1.5	<i>ns</i>

(b)

		Dw (ratio 7d treatment / initial)								
		WT	mds5	<i>p</i>	mds42	<i>p</i>	sx1.7	<i>p</i>	sx6.10	<i>p</i>
Leaves	<i>high light</i>	4.3	3.8	*	3.1	**	4.4	<i>ns</i>	4.2	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	1.3	1.3	<i>ns</i>	1.3	<i>ns</i>	1.7	<i>ns</i>	1.4	<i>ns</i>
Stems	<i>high light</i>	2.4	1.8	*	2.2	<i>ns</i>	3.3	<i>ns</i>	2.5	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	1.1	1.0	<i>ns</i>	1.2	<i>ns</i>	1.6	<i>ns</i>	1.1	<i>ns</i>
Roots	<i>high light</i>	3.4	3.4	<i>ns</i>	2.4	**	3.7	<i>ns</i>	3.3	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	1.6	1.1	<i>ns</i>	1.4	<i>ns</i>	1.6	<i>ns</i>	1.4	<i>ns</i>

Total dry weight after growth under low light conditions and following 7 days at high light was also monitored. Under high light, leaves and stems more than doubled their dry weight (**Table 1 b**). Under low light, dry weight increased more slowly. Dry weight of leaves was significantly lower in MDHAR silenced lines but only in the case of the high light treatment. Dry weight of roots showed a large increase under high light compared to low light. It is worth noticing that the mds42 silenced line showed a lower increase in its root dry weight under high light and mds5 a lower increase in dry stem weight.

Photosynthetic activity under high light and stomatal conductance are decreased by MDHAR silencing

Measurements of stomatal conductance revealed a large decrease during the very first hours of high light compared to low light (**Table 2**). After 100h under high light, stomatal conductance was higher than under low light. MDHAR silenced lines showed a reduced stomatal conductance under high light after 100h of treatment.

Clear differences appear between low light plantlets and high light plantlets in term of net photosynthesis (**Table 2**). Under high light, photosynthetic activity was strongly increased (from $3.87\mu\text{mol.CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ under low light to $19.50\mu\text{mol.CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ under high light for the wild type). After 4h and 100h of high light, MDHAR silenced lines showed reduced photosynthetic activity compared to other lines. No difference was noticed under low light between genotypes after 4h and 100h of high light.

The Fv/Fm ratio is used to evaluate photosystem II (PSII) efficiency and is an indication of plant photosynthetic performance. An optimum is reached when the Fv/Fm is 0.85 (Genty et al., 1989; Murchie and Lawson, 2013), indicating that plants are not photosynthetically stressed. Under low light, tomato plantlets were not under photosynthetic stress (0.84 during the whole experiment). In contrast, high light plantlets showed a reduced Fv/Fm ratio (**Table 2**), indicating a stress for PSII. The Fv/Fm ratio tended to decrease strongly in the first hour of the treatment (down to 0.63), and started to increase again at the end of the experiment (up to 0.80), indicating some adaptation. MDHAR silenced lines were the most affected lines; the Fv/Fm ratio was significantly lower for all measurements and MDHAR silenced lines were strongly affected by high light treatment.

MDHAR silenced lines show differences in yield due to a small fruited phenotype

In a greenhouse experiment, total fruit yield was measured for MDHAR silenced lines, MDHAR overexpressing lines and wild type under normal growth conditions. Yield was largely decreased per plant for MDHAR silenced lines (**Table 3**). No difference between MDHAR overexpressing lines and wild type was noted.

Table 2: Stomatal conductance expressed in $\mu\text{mol of H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, photosynthetic activity expressed in $\mu\text{mol of CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and chlorophyll fluorescence measurement (Fv/Fm) after 1h, 4h and 100h of high light or low light treatment. Photosynthetic activity and stomatal conductance were measured with a LI-6400XT LICOR and the Fv/Fm was measured with Fluorescence Monitoring System (FMS 1, Hansatech®, Kings Lynn, Norfolk, UK) on 6 leaves per genotype and treatment. Data are means of two independent lines for WT, MDHAR silenced and overexpressing lines. Two stars indicate significant differences with the wild type ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$).

(a)

treatment	genotype	Stomatal conductance ($\mu\text{mol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)					
		T+1h	<i>p</i>	T+4h	<i>p</i>	T+100h	<i>p</i>
<i>high light</i>	MDHAR -	0.06	<i>ns</i>	0.08	<i>ns</i>	0.33	**
	WT	0.07		0.13		0.40	
	MDHAR +	0.06	<i>ns</i>	0.11	<i>ns</i>	0.38	<i>ns</i>
<i>low light</i>	MDHAR -	0.27	<i>ns</i>	0.16	<i>ns</i>	0.24	*
	WT	0.24		0.17		0.19	
	MDHAR +	0.25	<i>ns</i>	0.16	<i>ns</i>	0.24	<i>ns</i>

(b)

treatment	genotype	Photosynthetic activity ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)						Fv/Fm					
		T+1h	<i>p</i>	T+4h	<i>p</i>	T+100h	<i>p</i>	T+1h	<i>p</i>	T+4h	<i>p</i>	T+168h	<i>p</i>
<i>high light</i>	MDHAR -	10.16	<i>ns</i>	8.65	**	17.46	**	0.70	*	0.63	*	0.77	*
	WT	10.55		11.64		19.50		0.74		0.66		0.79	
	MDHAR +	11.18	*	10.79	<i>ns</i>	19.53	<i>ns</i>	0.72	<i>ns</i>	0.68	<i>ns</i>	0.80	<i>ns</i>
<i>low light</i>	MDHAR -	4.75	**	3.93	<i>ns</i>	3.75	<i>ns</i>	0.84	<i>ns</i>	0.84	<i>ns</i>	0.84	<i>ns</i>
	WT	5.89		4.60		3.87		0.84		0.84		0.84	
	MDHAR +	5.18	**	3.87	<i>ns</i>	3.91	<i>ns</i>	0.84	<i>ns</i>	0.84	<i>ns</i>	0.84	<i>ns</i>

A preliminary characterization of MDHAR silenced lines revealed a clear small-fruited phenotype (phenotype present in at least one third of all primary transformants, data not shown), which could explain differences in terms of yield. From 3 days post anthesis to ripening, fruits from both MDHAR silenced lines are significantly smaller than those of wild type, mds5 being the most affected line (**Figure 2 a, b, c, d**). To determine if the differences in fruit size are due to a modification in cell division or cell expansion, we performed transversal sections on fruits harvested 3 days after anthesis (**Figure 2 c**). Cell number was measured in the pericarp and revealed no differences between the WT and the MDHAR silenced lines (**Figure 2 d**). Measurement of cell diameter revealed that fruit cell size is affected by MDHAR silencing. Indeed, cells are 20% smaller in mds5 and 12% smaller in mds3 when compared to WT, although for mds3 this difference is not statistically significant (**Figure 2 d**).

Total fruit yield was measured for MDHAR silenced lines and wild type on 6 trusses per plant under normal growth conditions as well as under conditions where carbon is limiting for growth. Total yield of MDHAR silenced lines was significantly reduced compared to wild type under control growth conditions, as previously seen (**Figure 3 a**). Fruit number per truss was not affected, unlike fruit weight of MDHAR silenced lines (**Figure 3 b**), mds5 had fruits with the most reduced size (4.8g compared to 6.8g for wild type fruit). Total yield per plant was examined under a carbon limitation treatment (removal of 2 leaves out of 3) leading to a decrease in the quantity of assimilates for fruits. Under such stress, yield was decreased for all lines (**Figure 3 a**). The yield of the mds5 line was strongly affected by carbon limitation, and fruit weight was reduced by over 50% compared to the wild type fruit weight (**Figure 3 b**).

In order to complete these analyses, the fruit load of plants cultivated in the greenhouse was limited to five per truss (pruned condition), instead of 15 (unpruned). Phenotypic differences were reduced in plants where fruit number was limited. Pruning made the fruit weight difference between MDHAR silenced lines and wild type decrease from 36% to 18% for mds3 and from 60% to 43% for mds5 (**Figure 3 c**). MDHAR overexpressing lines showed no fruit weight differences with the wild type, under either condition.

Influence of MDHAR activity on the metabolome of tomato plantlets under high light or low light

This isoform of MDHAR (MDHAR3) has already been shown to negatively affect ascorbate levels in tissues of transgenic plants in a light-dependent manner (Gest et al. 2013a; Haroldsen et al., 2011). We confirmed that MDHAR activity is negatively correlated to ascorbate content in orange and red fruits and also in stems under high light for silenced plants and in young leaves but only for the overexpressing plants, the complete set of data are shown in **Table 4**.

Table 3: Fruit yield per plant (in grams) of cherry tomato MDHAR silenced lines, MDHAR overexpressing lines and wild type (WT) under normal growth conditions. Plants were grown in the greenhouse in autumn. Yields were estimated on 6 trusses left unpruned. Two stars indicate significant differences with the wild type ($p < 0.01$).

	Total fruit yield / plant (g)	p
WT	383.3	
mds3	293.8	**
mds5	300.8	**
sx1.7	391.4	ns
sx6.10	407.3	ns

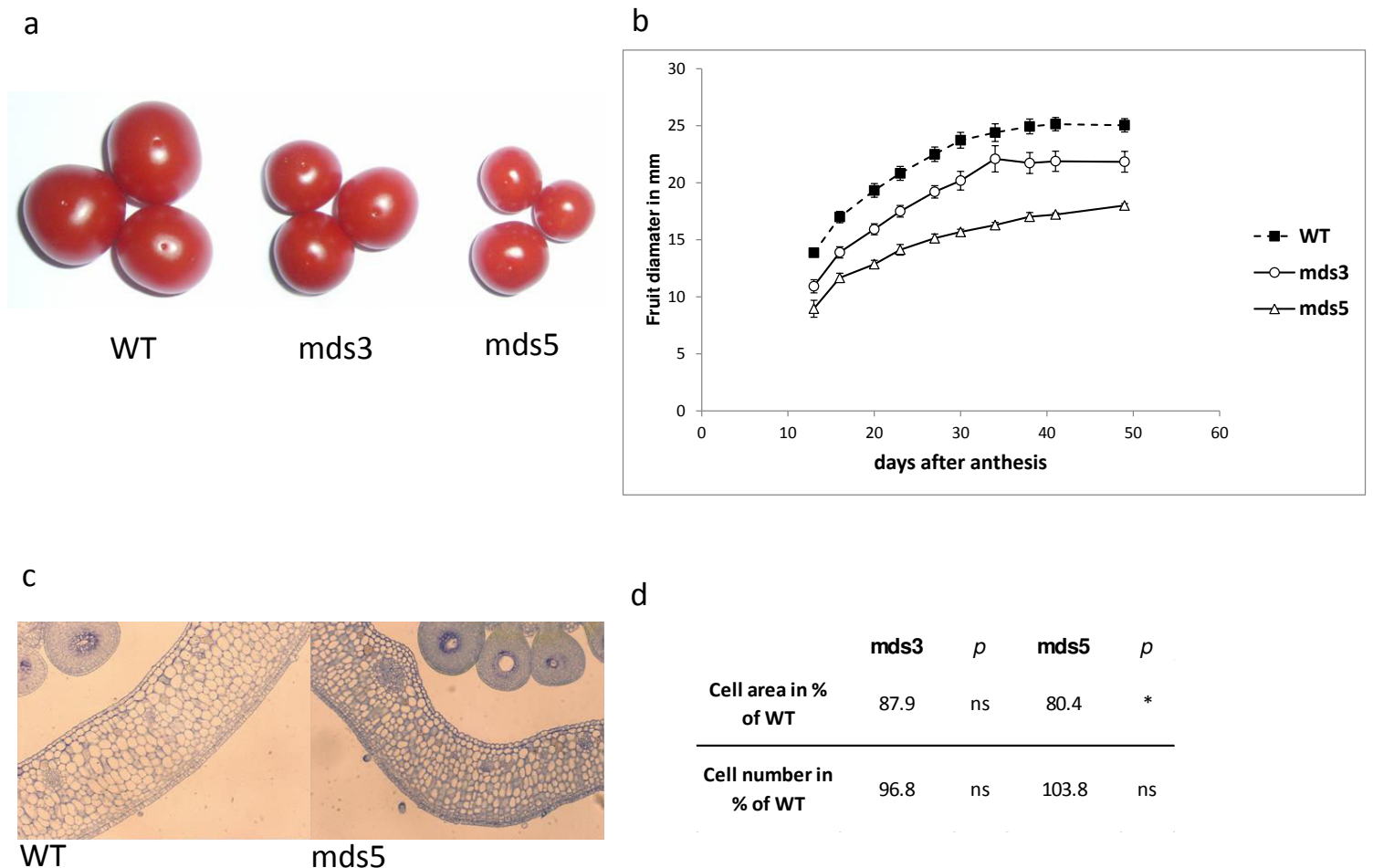


Figure 2: Fruit growth of MDHAR silenced lines and wild type (WT). Plants were grown in a greenhouse in Spring and fruits harvested in May-June.

(a) Pictures of representative fruits harvested at maturity from WT and two independent MDHAR silenced lines.

(b) Fruit diameter was measured twice a week from 12 days after anthesis to maturity using electronic calipers. Data are means (\pm SD) from 12 fruits from 2 different trusses on at least 3 plants per genotype.

(c) Images of transversal sections of fruit pericarp from WT and mds5 lines three days after anthesis using a Leica automatic camera on a light microscope.

(d) Average pericarp cell number and size in mds3 and mds5 lines compared to wild type calculated by analyzing the transversal sections from part (c) using Image J software. Five fruits were analyzed from each genotype and five sections per fruit. One star indicates significant difference with wild type ($p < 0.05$).

Metabolic analyses were performed on MDHAR silenced lines and MDHAR overexpressed lines, grown under the different light conditions described above, and compared to the metabolic profile of wild type during the first day of high light or low light treatment. Results are shown as heat maps (**Figure 4 a, b**). With the exception of sugars (see sections below) under high light, the metabolome of MDHAR silenced lines and MDHAR overexpressed lines were largely unaffected by a modification in MDHAR activity. We noticed that *myo*-inositol decreased under high light and that quinic acid was accumulated under low light in MDHAR silenced lines compared to wild type.

These observations were confirmed by an independent experiment aiming to trigger photo-oxidative stress on plantlets (wild type and silenced lines only) grown under high light intensity ($1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and low temperatures ($12^{\circ}\text{C}/10^{\circ}\text{C}$ on a day/night cycle). The metabolic profile of individual MDHAR silenced lines (**Figure 4 c**) showed differences in sugar and also amino acid accumulation after 15 days of growth under high light and low temperature. The amino acids phenylalanine and tryptophan accumulated in *mds5* more than in wild type plants (**Supporting Information Figure S1**). In addition, *mds3* and *mds42* lines showed lower accumulation of sucrose and lines *mds5* and *mds42* had half the level of glucose of wild type plants.

Soluble sugar accumulation is modified in MDHAR lines

Sugars are directly related to photosynthesis and carbon fixation and could be accumulated differently in our tomato genotypes, sugar metabolism was therefore surveyed during the first day of light treatment. Sucrose was highly and rapidly accumulated in high light plantlets, compared to the profile obtained in low light (**Figure 5 a**). MDHAR silenced lines accumulated less sucrose than wild type and MDHAR overexpressing lines (significant after 3h and 6h of light treatment). Glucose was accumulated in high light plantlets after 3h and 6h of light treatment compared to low light (**Figure 5 b**). MDHAR silenced lines accumulated less glucose than wild type and MDHAR overexpressing lines after 6h of treatment. Fructose content was neither significantly different between light treatments nor between genotypes during the first day (**Figure 5 c**). No significant difference was noticed between wild type and MDHAR overexpressing lines.

Enzymes involved in sugar metabolism of MDHAR silenced lines are not modified under high light

The modifications observed in hexose and sucrose contents in MDHAR silenced lines led us to assay activities of key enzymes involved in carbohydrate metabolism and carbohydrate partitioning: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and invertases (acidic (AI) and neutral (NI) invertases).

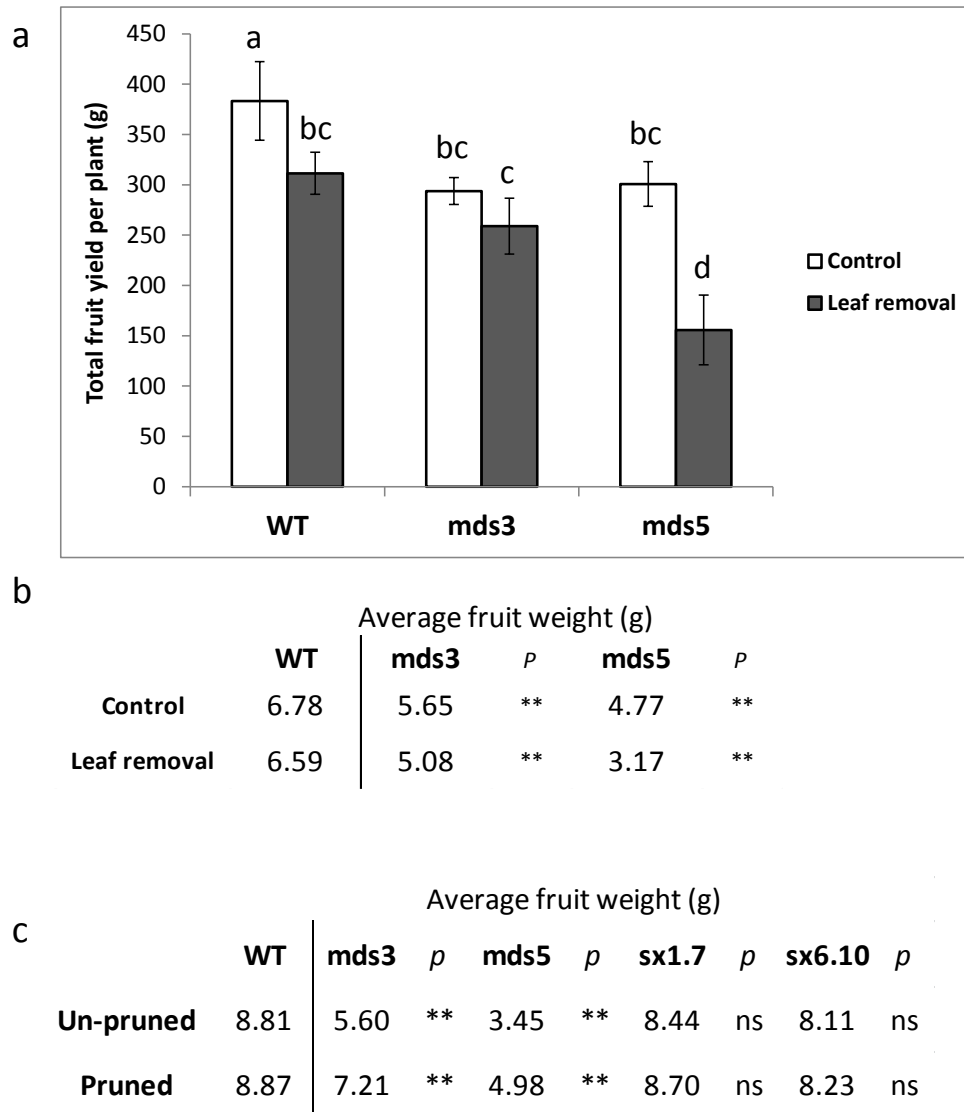


Figure 3: (a) Total fruit yield per plant (in grams) of WT and MDHAR silenced lines. Yield was also measured when plants were subjected to a leaf removal treatment (two leaves out of three). Data are means from 4 plants per genotype and per treatment on 6 trusses left unpruned. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

(b) Average fruit weight (in grams) of MDHAR silenced lines and wild type (WT) under normal growth condition (black bars) or carbon limitation (white bars). Leaf removal treatment as described in part (a).

(c) Effect of truss pruning on average fruit weight. Fruit weight was measured in WT, MDHAR silenced lines and MDHAR overexpressed lines in two different conditions; either trusses were left unpruned (approximately 15 fruits per truss) or trusses were pruned to 5 fruits per truss. Pruning was performed immediately after fruit set.

(b and c) Two stars indicate significant differences with wild type ($p < 0.01$).

Enzymes activities were measured during the first day after 6 h of high light and low light treatment (**Table 5**) as this corresponds to when sugar differences were at a maximum. Supporting Information Table S5 shows data from 3h and 7 days. Activity of G6PDH and acid invertase revealed that these enzymes were regulated by light as plantlets under high light exhibited lower enzymatic activities. Neutral invertase was not affected by light regime. No clear tendency appears either under high light or under low light for neutral invertase and acid invertase that allow us to discriminate genotypes. Only the mds5 line showed a differential G6PDH activity after 6 hours of high light compared to other lines where it was significantly higher.

Fruit of different developmental stages also show modified sugar levels

Sugar content was assayed on fruits at different ripening stages (20 days after anthesis (20DAA), mature green fruit, orange stage and red fruit) of MDHAR silenced lines, MDHAR overexpressing lines and WT (**Figure 6 a, b and c**). The transition between 20DAA and mature green corresponds to the growth phase of tomato fruits, and ripening starts at the end of the mature green stage and ends with red fruits. Sucrose content tends to decrease during tomato ripening, the highest concentration was observed in 20DAA fruits (**Figure 6 a**). Sucrose content was significantly reduced in MDHAR silenced lines at 20DAA and significantly increased in one overexpressing line. Sucrose concentration was also reduced at the mature green stage in silenced lines. However, the sucrose concentration was higher in the mds5 line in orange fruit. No differences were noticed in red fruits between lines. Glucose tends to accumulate during ripening of tomato, with a peak in red fruits (**Figure 6 b**). The glucose content did not reveal a clear trend to allow discrimination of lines. However, mds5 has the highest concentration of glucose in red fruits. The fructose content tends to increase during ripening of tomato, with a peak concentration in red fruits (**Figure 6 c**). The fructose content was significantly higher in MDHAR silenced lines at the mature green fruit stage compared to other lines, and also in orange fruit for mds3 and red fruit for mds5.

Discussion

Diminution of MDHAR activity induces slower growth and affects yield due to a small fruited phenotype

Growth processes at early stages are clearly affected by MDHAR silencing as stem length, leaf area and root size are particularly reduced in young plantlets. Interestingly, no difference was noticed for mature (45 day-old) plants in the greenhouse (data not shown). MDHAR silenced lines also exhibit a decreased yield, which we have shown is linked to fruit weight (**Figure 3 b**). As young leaves of plantlets and fruits are affected, we conclude that it is predominantly sink tissues and organs that are affected by modification of MDHAR activity.

Table 4: Reduced ascorbate (AsA) and oxidized ascorbate (DHA) content in (a) leaves and (b) stems after 7 days of light treatment and in (c) fruits of MDHAR overexpressing lines (sx1.7 and sx6.10), MDHAR silenced lines (mds5 and mds42) and wild type. Results are expressed in mg of AsA or DHA per 100g of Dw. One star indicates significant differences with the wild type ($p < 0.05$).

(a)		mg/100g Dw								
leaves		WT	mds5	$p < 0.05$	mds42	$p < 0.05$	sx1.7	$p < 0.05$	sx6.10	$p < 0.05$
<i>high light</i>	AsA	681.8	742.3	ns	564.1	*	607.6	ns	572.7	*
	DHA	101.6	115.2	ns	146.1	*	105.9	ns	82.2	ns
	redox (AsA/AsA+DHA)	0.87	0.87	ns	0.79	*	0.85	ns	0.87	ns
<i>low light</i>	AsA	352.8	291.9	ns	251.5	*	221.2	*	282.3	*
	DHA	85.5	67.4	ns	91.9	ns	73.6	ns	76.5	ns
	redox (AsA/AsA+DHA)	0.80	0.81	ns	0.73	ns	0.75	ns	0.79	ns
(b)		mg/100g Dw								
stems		WT	mds5	$p < 0.05$	mds42	$p < 0.05$	sx1.7	$p < 0.05$	sx6.10	$p < 0.05$
<i>high light</i>	AsA	105.0	125.2	*	169.3	*	115.6	ns	101.5	ns
	DHA	43.5	54.0	*	48.9	ns	41.4	ns	34.6	*
	redox (AsA/AsA+DHA)	0.71	0.70	ns	0.78	*	0.74	ns	0.75	ns
(c)		mg/100g Dw								
fruits		WT	mds5	$p < 0.05$	mds3	$p < 0.05$	sx1.7	$p < 0.05$	sx6.10	$p < 0.05$
<i>20 DAA</i>	AsA	182.9	193.6	ns	191.0	ns	182.3	ns	182.8	ns
	DHA	26.4	22.6	ns	19.4	ns	30.9	ns	19.1	ns
	redox (AsA/AsA+DHA)	0.87	0.89	ns	0.91	ns	0.85	ns	0.90	ns
<i>Mature Green fruit</i>	AsA	147.6	167.9	ns	162.0	ns	132.3	ns	136.9	ns
	DHA	3.0	4.4	ns	ND		12.2	ns	12.1	ns
	redox (AsA/AsA+DHA)	0.98	0.97	ns	-		0.92	*	0.92	ns
<i>Orange fruit</i>	AsA	191.7	230.0	*	238.7	*	179.8	ns	179.0	ns
	DHA	ND	ND		ND		5.4	ns	ND	
	redox (AsA/AsA+DHA)	-	-		-		0.97	ns	-	
<i>Red fruit</i>	AsA	260.3	346.1	*	307.5	*	225.9	ns	232.7	ns
	DHA	ND	ND		1.3		3.0	ns	ND	
	redox (AsA/AsA+DHA)	-	-		0.99		0.99		-	

Analysis of cell number and cell size in fruit, where the phenotype was the most obvious, led us to the conclusion that for the fruit phenotype, only cell size was affected in MDHAR silenced lines, suggesting that cell expansion rather than cell division was affected. The ascorbate and MDHA radical couple plays an essential role in growth processes of plant cells. In the case of onion root elongation as mentioned by Gonzalez-Reyes et al. (1995), the MDHA radical induced a high vacuolization leading to cell growth. A high MDHA content should be able to provoke a high growth rate, despite this observation we observe a lower growth rate compared to wild type. Therefore other processes involving feedback mechanisms or hormonal regulation must be involved in the phenotypes described in this study: a good candidate is auxin metabolism and ascorbate oxidase (which has the opposite activity to MDHAR) which are closely related. Cherry tomato transgenic lines showing a diminution of ascorbate oxidase (AO) activity have been studied by Garchery et al. (2013). It is worth pointing out that the exact opposite phenotype has been observed in this study compared to those described for ascorbate oxidase RNAi lines: yield was increased or maintained under stress conditions in these AO silenced lines. Furthermore, sugar content was also increased in leaves and in fruits of the ascorbate oxidase lines.

Some of our results may be explained by the alteration in carbon metabolism of our lines. For example, addition of sugars to the growth medium partially restored the wild type phenotype, whereas leaf removal from mature plants led to an even greater decrease in fruit size for *mds5* (**Figure 3 b**), whilst reducing fruit load partially restored the phenotype of MDHAR silenced lines. These observations clearly highlight the essential role of carbohydrate metabolism and partitioning in fruit and plantlet phenotypes and imply that the MDHAR silenced lines are carbon-limited. Such carbon deficiency could be related to stomatal conductance and/or photosynthesis that are altered in MDHAR silenced lines, resulting in the phenotypes observed.

MDHAR activity influences photosynthetic activity through stomatal closure

Stomatal conductance decreased during the first hours of high light treatment, then was higher than under low light indicating improvement of gas exchange, resulting in higher photosynthetic rates. Interestingly, stomatal conductance of MDHAR silenced lines was significantly lower under high light compared to wild type and MDHAR overexpressing lines after 100h of treatment. Stomatal conductance induces modifications of the transpiration rate (**Supporting Information Table S6**), thus MDHAR silenced lines showed a reduced transpiration rate and photosynthesis was also decreased. Kim et al. (2013) showed that DHAR over-expression in rice lead to an enhancement of the photosynthetic activity that is related to yield improvement and improved growth.



Figure 4: Metabolic profile of transgenic tomato leaves under-expressing MDHAR (MDHAR -) or over-expressing MDHAR (MDHAR +) after 7 days under (a) high light or (b) low light. Plantlets were grown in low light intensity ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and placed under high light ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) at T as described in the legend for Figure 1. Sampling of leaves was carried out during the first day of treatment (T+1h, T+3h, T+6h) and material was immediately frozen in liquid nitrogen. Metabolites were detected by GC-MS analysis and expressed in arbitrary units.gDw⁻¹ (relative concentrations determined by comparison with the internal standard). Heat maps represent concentrations of all metabolites for MDHAR silenced lines and MDHAR overexpressed lines relative to the wild type profile at each time point. Six replicates (independent plants) per time point and genotype were used.

(c) Metabolic profiles of transgenic MDHAR silenced lines in the aerial part (stem + leaves) of tomato plantlets at high light intensity and low temperature (12°C). Plantlets were germinated at normal light intensity ($380 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and placed under high light ($1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) at 12°C for 15 days. Metabolites were detected by GC-MS analysis. Metabolite levels are expressed in arbitrary units.gFw⁻¹ (relative concentration determined by comparison with the internal standard). The heat map represents metabolite concentrations of all metabolites for each genotype relative to the wild type profile. Six replicates (independent plants) per condition and genotype were used.

One star indicates significant difference with the wild type ($p < 0.05$).

In the case of MDHAR silencing, growth phenotypes have been observed under low light and also under high light, so that as there are no changes in photosynthetic activity under low light between our MDHAR transgenic lines, photosynthesis cannot explain the phenotype of our MDHAR silenced lines. As stomatal closure was induced and photosynthesis was slowed in MDHAR silenced lines, we focused on the impact on the global metabolome and especially sugar metabolism. With the exception of soluble sugars, which we discuss below, there were few changes.

Soluble sugar accumulation is modified in MDHAR silenced lines leading to slower early growth

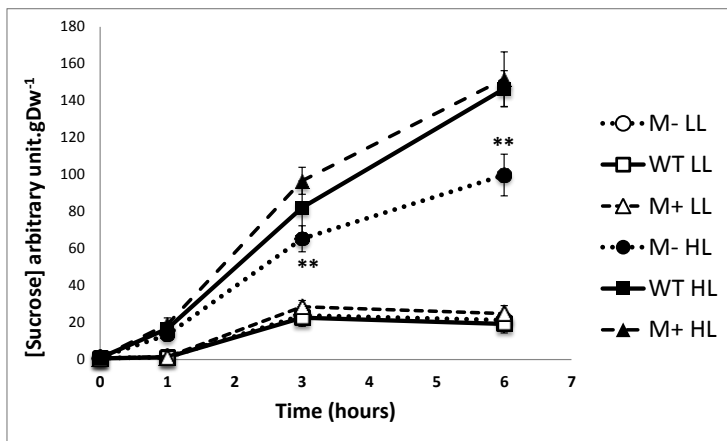
Glucose and sucrose deficiency of MDHAR silenced lines (**Figure 5**) under high light led us to consider known links between sugar and growth. Notably, the relationship between glucose and ABA metabolism revealed considerable glucose control of ABA biosynthesis (Cheng et al., 2002). For our MDHAR silenced lines, glucose accumulation is repressed under high light and might disturb hormone homeostasis via ABA metabolism, resulting in a slower early growth phenotype. What is particularly interesting is that ABA signaling is partially driven through *ABI4* (ABA-INSENSITIVE-4) transcription factor, which has very close links with ascorbate metabolism (Veljovic-Jovanovic et al., 2001) through redox control of growth (Kerchev et al., 2011). To emphasize this network, it has been proved that *ABI4* transcription factor was activated by glucose (Foyer et al., 2012), so that *ABI4* might be the link between ABA, sugar and ascorbate.

Recent work has shown that a network connecting the activity of enzymes involved in carbon partitioning, ascorbate and growth could exist (Xiang et al., 2011). Notably, invertases can regulate sucrose allocation to sinks and thus plant development under control of the environment. Enzymes involved in carbohydrate metabolism were surveyed on plantlets grown under different light intensities. G6PDH is the rate limiting step of the pentose phosphate pathway and catalyzes the oxidation of glucose-6-phosphate to generate reducing power in the form of NADPH. Acid and neutral invertases catalyze sucrose cleavage into glucose and fructose. However, we could not find differences in our transgenic lines in term of invertase activity (both acid and neutral) during our different light experiments on plantlets.

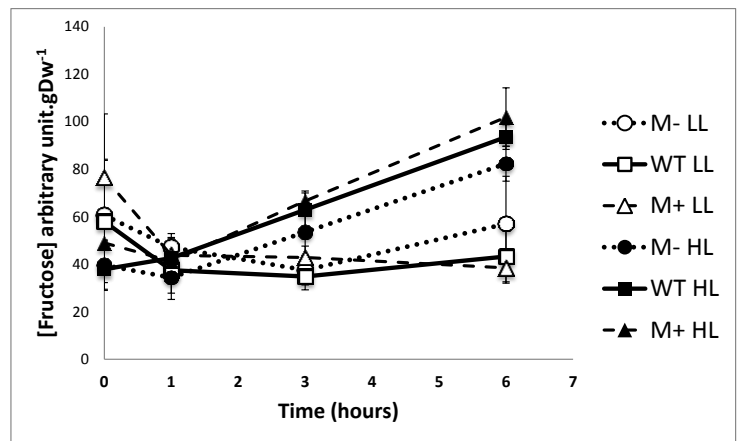
Soluble sugar accumulation is modified in MDHAR silenced lines leading to a small fruited phenotype

Besides carbon assimilation, carbon partitioning can influence plant growth. Indeed, organic carbon produced by source organs can be directly used by source cells, or exported to sink organs from the symplasm during early stages and then from the apoplasm during ripening and hexose accumulation (Ruan et Patrick, 1995). The cell expansion of fruit is more dependent upon the allocation of assimilates from photosynthetic organs than on its own photosynthetic capacity (Lytovchenko et al., 2011).

a



c



b

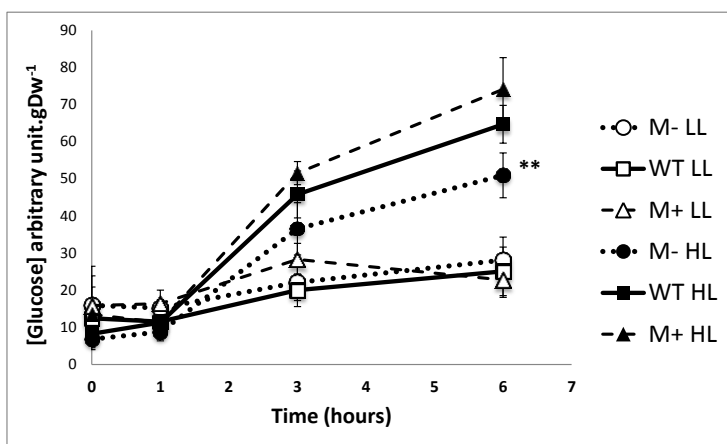


Figure 5: (a) Sucrose, (b) glucose and (c) fructose concentrations under low light ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, white symbols) or high light ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, black symbols). The wild type (WT) is represented using square symbols, MDHAR silenced lines as circles and MDHAR overexpressing lines as triangles. Sugars were measured by GC-MS analysis and levels expressed in arbitrary units.gDw⁻¹ (relative concentration determined by comparison with an internal standard). Six replicates (independent plants) per condition and genotype were used. Two stars indicate a significant difference with wild type ($p < 0.01$).

Table 5: Activity of enzymes related to carbohydrate metabolism and partitioning in leaves of MDHAR silenced lines, MDHAR overexpressed lines and wild type (WT) after 6 hours under high light or low light. The activity of enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), acid invertase (AI) and neutral invertase (NI) are expressed in nmol.gFw⁻¹.min⁻¹. Two stars indicates significant difference with wild type ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$), one point ($p < 0.1$).

			6h of treatment							
		WT	mds5	<i>p</i>	mds42	<i>p</i>	sx1.7	<i>p</i>	sx6.10	<i>p</i>
G6PDH (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	high light	33.7	66.5	**	49.2	ns	39.6	ns	51.3	ns
	low light	66.3	57.7	ns	64.9	ns	66.4	ns	70.5	ns
	<i>p</i> (light effect)	**	ns		ns		*		ns	
AI (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	high light	92.1	75.8	ns	135.1	ns	101.6	ns	161.9	**
	low light	126.1	113.4	ns	141.3	ns	176.9	**	135.2	ns
	<i>p</i> (light effect)	*	*		ns		**		ns	
NI (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	high light	62.0	57.2	ns	71.7	ns	48.7	ns	66.2	ns
	low light	63.5	73.1	ns	68.4	ns	77.8	ns	97.1	*
	<i>p</i> (light effect)	ns	ns		ns		*		.	

In our study, photosynthetic activity was not altered in leaves of older tomato plants (data not shown), meaning that transport of assimilates from source to sink (young fruits, growing areas of plantlets) might be disturbed and explain the small-fruited phenotype. Pruning experiments would tend to confirm this hypothesis (**Figure 1 c and 3 c**). Generally, when sink activity is decreased as in the case of pruning, assimilates can accumulate in leaves and photosynthetic activity becomes inhibited (Paul et Pellny, 2003). Therefore, sugar supply to fruit is largely dependent on phloem unloading and thus on transport capacity. Whereas glucose and fructose are essentially involved in cell metabolism, sucrose is the main form of sugar used by many plants for sugar export. We therefore hypothesized that in MDHAR silenced lines, growth of sink organs was altered partly because they did not receive enough carbon from source organs. Sucrose content (**Figure 6 a**) was lower at early growth stages of the fruit (20DAA and also at mature green fruit stage). It appears clearly that this decrease of sucrose content at an early stage of growth is related to the final fruit size and thus to the decrease of yield in MDHAR silenced plants. To complete these observations, further analyses of phloem loading and phloem composition may give us potential explanations for the phenotype observed.

Conclusion

MDHAR activity plays a role in growth processes in cherry tomato and also impacts stomata, photosynthesis and sugar metabolism. Cherry tomato transgenic lines defined by a diminution of AO activity (Garchery et al., 2013) or a diminution of MDHAR activity showed the opposite phenotypes in term of yield, sugar content and tolerance to environmental stress (drought, high light stress or carbon stress), therefore redox control of growth in cherry tomato could be regulated by the AsA/MDHA couple and lead to multiple effects on sugar accumulation and partitioning. Precise control of AO activity or MDHAR activity may therefore be a potential strategy to improve yield in crop species under oxidative stress conditions (as for drought or light stress).

Acknowledgements:

The authors declare that there are no conflicts of interest. We thank Gisele Riqueau for her technical assistance and the greenhouse staff at INRA Avignon; Valérie Serra for the photosynthesis measurements, Yves Gibon and Duyen Prodhomme from the Metabolome Facility of Bordeaux Functional Genomics Centre for enzymatic activity measurements. The oxidative stress experiment was performed at CEA Cadarache with the help of Michel Péan and Dominique Rumeau. The metabolome analysis in figure 4 c and Supporting Information Figure S1 was performed at Max Planck Institute of Golm. The PhD of Vincent Truffault was financed by INRA and the Provence-Alpes-Côte d'Azur region.

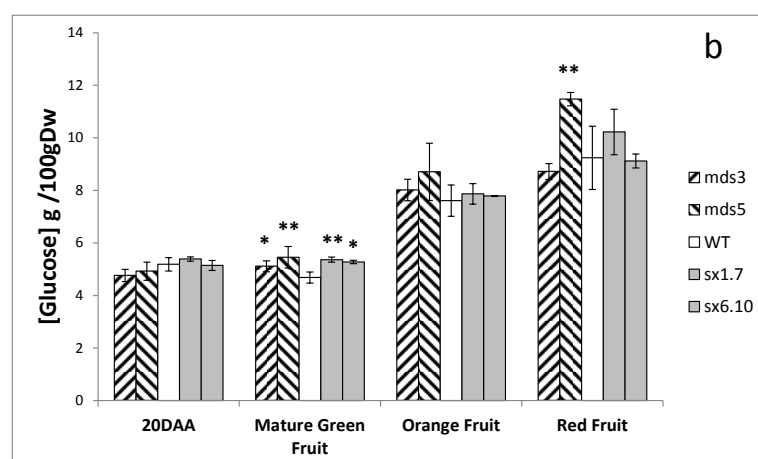
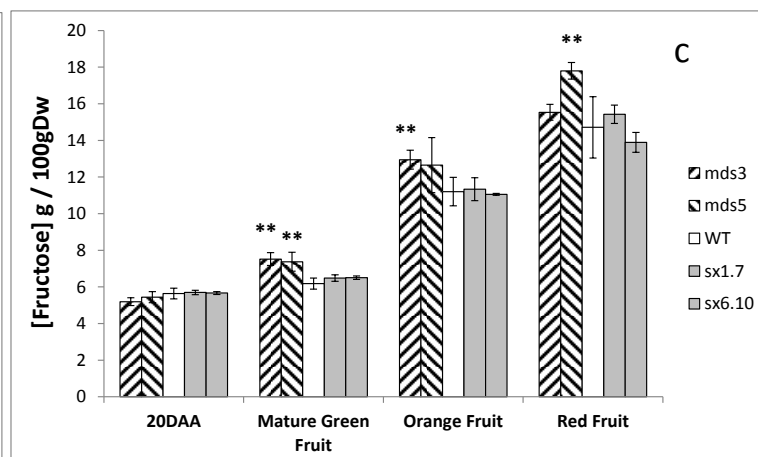
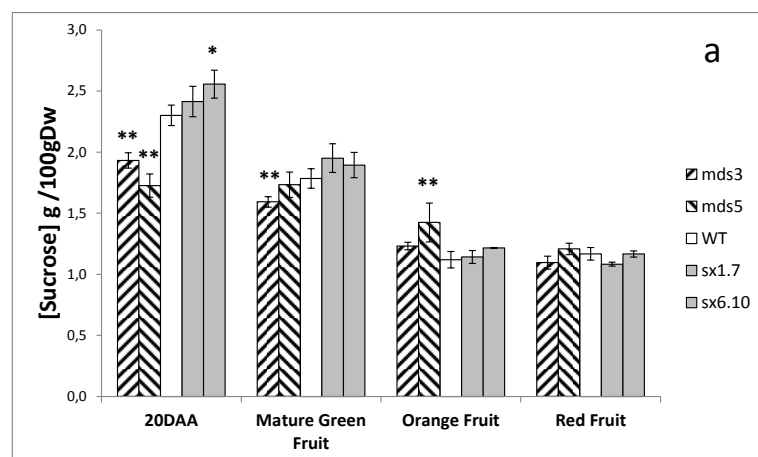


Figure 6: (a) Sucrose, (b) glucose and (c) fructose concentrations in tomato fruits harvested at different ripening stage (20 days after anthesis, mature green fruit, orange fruit and red fruit) of MDHAR silenced lines (hatched bars), MDHAR overexpressed (grey bars) and wild type (WT, white bars). Measurements of soluble sugars were carried out by HPLC. Six fruits were used as replicates per ripening stage and genotype. Two stars indicate a significant difference with wild type ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$).

Supplemental Data

Table S1: (a) MDHAR activity assayed on young leaves of plantlets of mds42 silenced line and wild type grown under high light. Results are expressed in μmoles of NADH oxidized per minute and per gram of fresh weight. (b) qRT-PCR was performed and relative transcripts abundance of MDHAR genes in transgenic lines was estimated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with the gene encoding translation initiation factor eIF4A as an internal constitutive control. One star indicates a significant difference with the wild type ($p < 0.05$).

MDHAR activity ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gFw}^{-1}$)				relative MDHAR expression		
p<0.05				p<0.05		
WT	0.040	± 0.00723		WT	1	
mds42	0.020	± 0.00511	*	mds42	0.79	*
				sx1.7	6,24	*
				sx6.10	5,8	*

Supplemental Data S2. Overview and checklist features of the metabolite reporting list

Peak/compound no.- number referenced back to the main text						
Ret. Time- Time expected, Tag Time Index and Time deviation						
Putative Name- putative identification of the metabolite/derivative						
Corresponding metabolite name in literature						
Mol. Formula- molecular formula of the metabolite or its FA adduct;						
Mass to charge ratio (m/z)						
Peak/Compound no.	Retention time	Putative metabolite name (Derivative)	Corresponding Metabolite in Literature	Metabolite Class	Mol formula	Mass to charge ratio (m/z)
1	6,58	M000071_A104002-101-xxx_NA_1037,28_TRUE_VAR5_ALK_Pyruvic acid (1MEOX) (1TMS)	Pyruvate	Organic acid	C ₃ H ₄ O ₃	174
2	7,35	M000100_A105001-101-xxx_NA_1044,47_TRUE_VAR5_ALK_Lactic acid (2TMS)	Lactate	Acid	C ₃ H ₅ O ₃	117
3	8,28	M000026_A110001-101-xxx_NA_1088,46_TRUE_VAR5_ALK Alanine (2TMS)	Alanine	Amino acids	C ₃ H ₇ NO ₂	116
4	9,22	M000070_A113002-101-xxx_NA_1118,32_TRUE_VAR5_ALK Oxalic acid (2TMS)	Oxalate	Dicarboxylic acid	C ₂ H ₂ O ₄	190
5	11,90	M000053_A129003-101-xxx_NA_1262,29_TRUE_VAR5_ALK Glycerol (3TMS)	Glycerol	Polyol	C ₃ H ₈ O ₃	205
6	12,00	M000075_A129001-101-xxx_NA_1262,42_TRUE_VAR5_ALK Phosphoric acid (3TMS)	Phosphoric acid	Acid phosphate	H ₃ PO ₄	299
7	12,50	M000029_A132003-101-xxx_NA_1295,77_TRUE_VAR5_ALK Proline (2TMS)	Proline	Amino acids	C ₅ H ₉ NO ₂	142
8	12,58	M000031_A133001-101-xxx_NA_1303,64_TRUE_VAR5_ALK Glycine (3TMS)	Glycine	Amino acids	C ₂ H ₅ NO ₂	174
9	12,80	M000076_A133003-101-xxx_NA_1300,72_TRUE_VAR5_ALK Maleic acid (2TMS)	Maleic acid	Acid dicarboxylic	C ₄ H ₄ O ₄	245
10	12,94	M000073_A135003-101-xxx_NA_1319,94_TRUE_VAR5_ALK Glyceric acid (3TMS)	Glycerate	Hydroxy acid	C ₃ H ₆ O ₄	189
12	13,05	M000074_A134001-101-xxx_NA_1310,36_TRUE_VAR5_ALK Succinic acid (2TMS)	Succinate	Dicarboxylic acid	C ₄ H ₆ O ₄	247
14	13,53	M000015_A138001-101-xxx_NA_1352,51_TRUE_VAR5_ALK Serine (3TMS)	Serine	Amino acids	C ₃ H ₇ NO ₃	218
15	13,68	M000067_A137001-101-xxx_NA_1346,8_TRUE_VAR5_ALK Fumaric acid (2TMS)	Fumarate	Acid dicarboxylic	C ₄ H ₄ O ₄	245
16	13,99	M000016_A140001-101-xxx_NA_1377,23_TRUE_VAR5_ALK Threonine (3TMS)	Threonine	Amino acids	C ₄ H ₉ NO ₃	218
17	16,08	M000065_A149001-101-xxx_NA_1478,99_TRUE_VAR5_ALK Malic acid (3TMS)	Malate	Organic acids	C ₄ H ₆ O ₅	233
18	16,79	M000114_A153003-101-xxx_NA_1526,01_TRUE_VAR5_ALK Butanoic acid, 4-amino- (3TMS)	GABA	Amino acids	C ₄ H ₉ NO ₂	174; 304
20	17,17	M000078_A156001-101-xxx_NA_1545,35_TRUE_VAR5_ALK Threonic acid (4TMS)	Threonate	Hydroxy acid	C ₄ H ₈ O ₅	292
21	18,50	M000011_A164001-101-xxx_NA_1629,63_TRUE_VAR5_ALK Phenylalanine (2TMS)	Phenylalanine	Amino acids	C ₉ H ₁₁ NO ₂	218
22	21,19	M000607_A181002-101-xxx_NA_1794,63_TRUE_VAR5_ALK Shikimic acid (4TMS)	Shikimate	Hydroxy acid	C ₇ H ₁₀ O ₅	204
23	21,24	M000069_A182004-101-xxx_NA_1804,71_TRUE_VAR5_ALK Citric acid (4TMS)	Citrate	Acid tricarboxylic	C ₆ H ₈ O ₇	273
24	21,71	M000007_A185001-101-xxx_NA_1842,69_TRUE_VAR5_ALK Quinic acid (5TMS)	Quinate	Hydroxy acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	345
25	21,80	M000082_A185002-101-xxx_NA_1839,58_TRUE_VAR5_ALK Dehydroascorbic acid dimer (2TMS)	Dehydroascorbate	Hydroxy acid	C ₆ H ₆ O ₆	316
26 + 27	21.9 + 22.07	M000606_A188004-101-xxx_NA_1863,13_TRUE_VAR5_ALK Fructose (1MEOX) (5TMS)	Fructose	Sugar hexose	C ₆ H ₁₂ O ₆	307
28 + 29	22.3 + 22.59	M000040_A191001-101-xxx_NA_1899,05_TRUE_VAR5_ALK Glucose (1MEOX) (5TMS)	Glucose	Sugar hexose	C ₆ H ₁₂ O ₆	205; 319
30	22,72	M000690_A196003-101-xxx_NA_1949,14_TRUE_VAR5_ALK Galacturonic acid (1MEOX) (5TMS)	Galacturonate	Acid	C ₆ H ₈ O ₇	333
31	23,00	M000221_A195005-101-xxx_NA_1938,08_TRUE_VAR5_ALK Glucuronic acid (1MEOX) (5TMS)	Glucuronate	Acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	333
32	23,30		2,3-Diketogulonate	Acid	C ₆ H ₈ O ₇	244
33	23,55	M000596_A199002-101-xxx_NA_1980,32_TRUE_VAR5_ALK Galactonic acid (6TMS)	Galactonate	Acid	C ₆ H ₁₁ O ₇	307
34	24,86	M000060_A209002-101-xxx_NA_2080,23_TRUE_VAR5_ALK Inositol, myo- (6TMS)	myo-Inositol	Polyol	C ₆ H ₁₄ O ₆	217; 305
35	25,85	M000649_A214001-101-xxx_NA_2135,55_TRUE_VAR5_ALK Caffeic acid, trans- (3TMS)	Caffeic acid	Acid phenylpropanoic	C ₉ H ₈ O ₄	219; 396
36	26,89	M000012_A223001-101-xxx_NA_2217,55_TRUE_VAR5_ALK Tryptophan (3TMS)	Tryptophan	Amino acids	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	202
37	27,26	M000485_A225002-101-xxx_NA_2243,45_TRUE_VAR5_ALK Octadecanoic acid (1TMS)	Stearic acid	Fatty acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	117; 341
38	31,20	M000044_A264001-101-xxx_NA_2622,87_TRUE_VAR5_ALK Sucrose (8TMS)	Sucrose	Sugar	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	361
39	35,18	M000003_A299001-101-xxx_NA_2977,33_TRUE_VAR5_ALK Quinic acid, 3-caffeoyl-, cis- (6TMS)	Chlorogenic acid	Phenylpropanoyl conjugate	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	255; 345

Table S3: Statistical analysis of (a) leaf area and (b) stem length data from **Figure 1**. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

(a) <i>Leaf area (cm²)</i>						
	T	<i>p</i> <0.05	HL	<i>p</i> <0.05	LL	<i>p</i> <0.05
WT	125.2	cd	149.9	bc	177.2	a
mds5	115.2	de	128.7	bcd	132.5	bcd
mds42	111.0	de	108.8	de	119.0	cde
sx1.7	89.9	e	117.6	cde	154.4	abc
sx6.10	122.3	cde	151.3	abc	161.8	ab

(b) <i>Stem length (cm)</i>						
	T	<i>p</i> <0.05	HL	<i>p</i> <0.05	LL	<i>p</i> <0.05
WT	15.9	ef	18.7	cd	20.1	bc
mds5	13.1	g	15.6	ef	17.5	de
mds42	12.5	g	15.3	f	17.8	d
sx1.7	12.2	g	18.4	cd	21.7	ab
sx6.10	17.6	de	21.9	a	20.1	abc

Table S4: (a) Total fresh weight and (b) total dry weight of leaves, stems and roots for wild type genotype, MDHAR silenced lines (mds5 and mds42) and MDHAR overexpressing lines (sx1.7 and sx6.10) at T and after 7 days of light treatment. Results are expressed in grams. One star indicates significant differences with the wild type ($p < 0.05$).

(a) <i>Fresh weight (g) after 7d</i>										
		WT	MD5	<i>p</i> <0.05	MD42	<i>p</i> <0.05	sx1.7	<i>p</i> <0.05	sx6.10	<i>p</i> <0.05
Leaves	<i>T</i>	0.98	0.94	ns	0.91	ns	0.79	*	0.98	ns
	<i>high light</i>	2.61	2.27	ns	1.83	*	2.13	ns	2.55	ns
	<i>low light</i>	1.49	1.19	ns	1.17	ns	1.33	ns	1.43	ns
Stems	<i>T</i>	0.87	0.72	ns	0.65	ns	0.59	*	0.99	ns
	<i>high light</i>	1.51	1.16	ns	0.96	*	1.37	ns	1.73	ns
	<i>low light</i>	1.10	0.92	ns	0.82	ns	1.04	ns	1.17	ns
Roots	<i>T</i>	0.37	0.35	ns	0.33	ns	0.26	ns	0.37	ns
	<i>high light</i>	1.41	1.14	ns	0.86	*	1.05	ns	1.22	ns
	<i>low light</i>	0.60	0.42	ns	0.46	ns	0.48	ns	0.56	ns

(b) <i>Dry weight (g) after 7d</i>										
		WT	MD5	<i>p</i> <0.05	MD42	<i>p</i> <0.05	sx1.7	<i>p</i> <0.05	sx6.10	<i>p</i> <0.05
Leaves	<i>T</i>	0.10	0.09	ns	0.09	ns	0.08	*	0.11	ns
	<i>high light</i>	0.46	0.36	*	0.30	*	0.36	*	0.44	ns
	<i>low light</i>	0.14	0.12	ns	0.12	ns	0.14	ns	0.15	ns
Stems	<i>T</i>	0.06	0.05	ns	0.04	ns	0.04	ns	0.07	ns
	<i>high light</i>	0.15	0.09	*	0.09	*	0.14	ns	0.18	ns
	<i>low light</i>	0.07	0.05	ns	0.05	ns	0.06	ns	0.08	ns
Roots	<i>T</i>	0.03	0.03	ns	0.03	ns	0.02	ns	0.03	ns
	<i>high light</i>	0.11	0.09	ns	0.07	ns	0.09	ns	0.10	ns
	<i>low light</i>	0.05	0.03	ns	0.04	ns	0.04	ns	0.04	ns

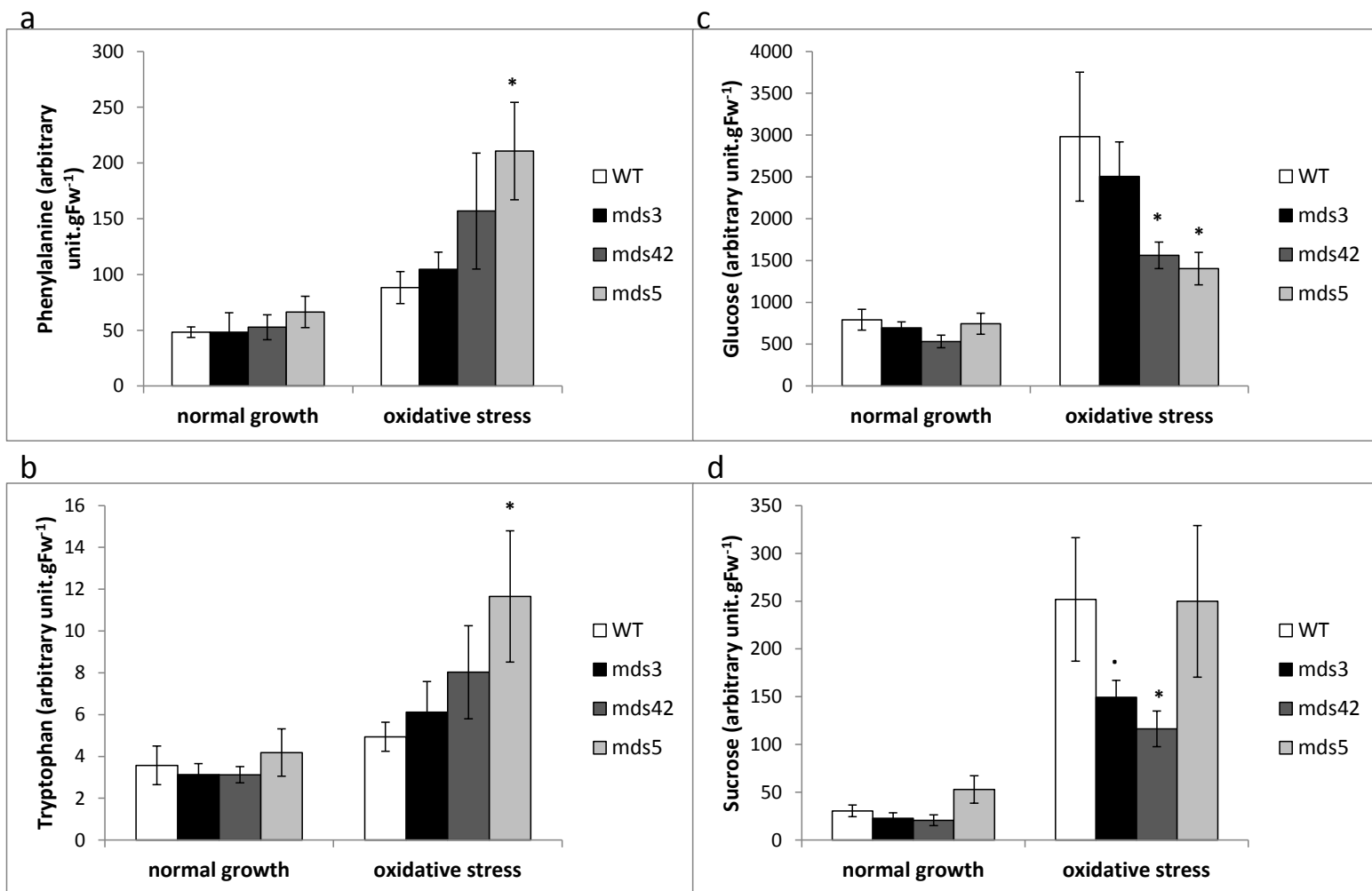


Figure S1: (a) Phenylalanine, (b) tryptophan, (c) glucose and (d) sucrose concentration under normal growth ($380 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) or under high light ($1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) at 12°C of wild type (white bars) and MDHAR silenced lines (dark bars). Metabolites were detected by GC-MS analysis and levels were expressed in arbitrary unit.gFw⁻¹ (relative concentration determined by comparison with an internal standard). Six replicates (independent plants) per condition and genotype were used. One star indicates a significant difference with wild type ($p < 0.05$), one point ($p < 0.1$).

Table S5: Enzymatic activity related to carbohydrate metabolism and partitioning of MDHAR silenced lines, MDHAR overexpressed lines and wild type (WT) plantlets after (a) 3 hours and (b) 7 days under high light or low light. Activity of enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), acid invertase (AI) and neutral invertase (NI) are expressed in nmol.gFw⁻¹.min⁻¹. Two stars indicate a significant difference with wild type (p<0.01), one star (p<0.05), one point (p<0.1).

(a)		3h of treatment								
		WT	mds5	<i>p</i>	mds42	<i>p</i>	sx1.7	<i>p</i>	sx6.10	<i>p</i>
G6PDH (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	<i>high light</i>	56.4	46.2	<i>ns</i>	63.3	<i>ns</i>	65.8	<i>ns</i>	50.4	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	43.2	45.7	<i>ns</i>	40.2	<i>ns</i>	77.9	**	57.7	<i>ns</i>
	<i>p (light effect)</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		*		<i>ns</i>		<i>ns</i>	
AI (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	<i>high light</i>	143.7	101.7	<i>ns</i>	130.8	<i>ns</i>	112.9	<i>ns</i>	89.4	*
	<i>low light</i>	96.1	96.8	<i>ns</i>	97.5	<i>ns</i>	102.9	<i>ns</i>	109.4	<i>ns</i>
	<i>p (light effect)</i>	**	<i>ns</i>		*		<i>ns</i>		<i>ns</i>	
NI (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	<i>high light</i>	65.7	68.2	<i>ns</i>	62.5	<i>ns</i>	88.7	*	70.9	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	57.1	49.8	<i>ns</i>	63.1	<i>ns</i>	78.3	*	45.4	<i>ns</i>
	<i>p (light effect)</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		*	
(b)		7 days of treatment								
		WT	mds5	<i>p</i>	mds42	<i>p</i>	sx1.7	<i>p</i>	sx6.10	<i>p</i>
G6PDH (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	<i>high light</i>	57.9	41.2	**	57.0	<i>ns</i>	47.6	<i>ns</i>	60.3	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	33.7	35.7	<i>ns</i>	34.9	<i>ns</i>	34.5	<i>ns</i>	25.7	<i>ns</i>
	<i>p (light effect)</i>	*	<i>ns</i>		.		<i>ns</i>		**	
AI (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	<i>high light</i>	95.3	99.9	<i>ns</i>	76.1	<i>ns</i>	114.0	<i>ns</i>	92.1	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	79.9	67.7	<i>ns</i>	73.0	<i>ns</i>	93.9	<i>ns</i>	96.3	<i>ns</i>
	<i>p (light effect)</i>	<i>ns</i>	.		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>	
NI (nmol.gFw ⁻¹ .min ⁻¹)	<i>high light</i>	61.6	56.1	<i>ns</i>	36.9	<i>ns</i>	56.1	<i>ns</i>	50.4	<i>ns</i>
	<i>low light</i>	54.6	68.0	<i>ns</i>	62.0	<i>ns</i>	64.9	<i>ns</i>	69.4	<i>ns</i>
	<i>p (light effect)</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		*		<i>ns</i>		<i>ns</i>	

Table S6: Transpiration rate expressed in $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and measured after 1h, 4h and 100h of high light or low light treatment with a LI-6400XT LICOR on 6 leaves per genotype and treatment. Data are means of two independent lines for WT, MDHAR silenced and overexpressing lines. Two stars indicate significant differences with the wild type ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$).

treatment	genotype	Transpiration rate ($\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)					
		T+1h	<i>p</i>	T+4h	<i>p</i>	T+100h	<i>p</i>
<i>high light</i>	MDHAR -	0.98	<i>ns</i>	1.36	**	2.61	*
	WT	1.07		2.00		3.06	
	MDHAR +	0.96	<i>ns</i>	1.83	<i>ns</i>	3.04	<i>ns</i>
<i>low light</i>	MDHAR -	2.00	<i>ns</i>	1.99	<i>ns</i>	2.20	<i>ns</i>
	WT	1.81		2.22		1.94	
	MDHAR +	2.00	<i>ns</i>	1.90	<i>ns</i>	2.33	<i>ns</i>

References

- Arrigoni O., De Tullio M.C.** (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1569**:1–9.
- Asard H., Barbaro R., Trost P., Bérczi A.** (2013) Cytochromes b561: ascorbate-mediated trans-membrane electron transport. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**:1026–1035.
- Cheng W.-H., Endo A., Zhou L., Penney J., Chen H.-C., Arroyo A.,..., Sheen J.** (2002) A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in Arabidopsis Glucose Signaling and Abscissic Acid Biosynthesis and Functions. *The Plant Cell* **14**:2723–2743.
- Csala M., Braun L., Mile V., Kardon T., Szarka A., Kupcsulik P., Mandl J., Bánhegyi G.** (1999) Ascorbate-mediated electron transfer in protein thiol oxidation in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* **460**:539–543.
- Davey M.W., Montagu M.V., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N.,..., Fletcher J.** (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**:825–860.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S. & Smirnoff N.** (2007) Two genes in Arabidopsis thaliana encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* **52**:673–689.
- Fotopoulos V., Sanmartin M., Kanellis A.K.** (2006) Effect of ascorbate oxidase over-expression on ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **57**:3933–3943.
- Foyer C.H., Kerchev P.I., Hancock R.D.** (2012) The ABA-INSENSITIVE-4 (ABI4) transcription factor links redox, hormone and sugar signaling pathways. *Plant Signaling & Behavior* **7**:276–281.
- Fry S.C.** (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal* **332** (Pt 2):507–515.
- Garchery C., Gest N., Do P.T., Alhagdow M., Baldet P., Menard G.,..., Stevens R.** (2013) A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. *Plant, Cell & Environment* **36**:159–175.
- Gautier H., Lopez-Lauri F., Massot C.** (2010) Impact of ripening and salinity on tomato fruit ascorbate content and enzymatic activities related to ascorbate recycling. *Functional Plant Science and Biotechnology* **4**:66–75.
- Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R.** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **990**:87–92.
- Gest N., Garchery C., Gautier H., Jiménez A., Stevens R.** (2013a) Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnology Journal* **11**:344–354.
- Gest N., Gautier H., Stevens R.** (2013b) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany* **64**:33–53.
- Gibon Y., Blaesing O.E., Hannemann J., Carillo P., Höhne M., Hendriks J.H.M.,..., Stitt M.** (2004) A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in Arabidopsis Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell* **16**:3304–3325.
- Gomez L., Rubio E., Augé M.** (2002) A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**:360–369.
- Gonzalez-Reyes J., Alcain F., Caler J., Serrano A., Cordoba F., Navas P.** (1995) Stimulation of Onion Root Elongation by Ascorbate and Ascorbate Free-Radical in Allium-Cepa L. *Protoplasma* **184**:31–35.
- Haroldsen, V. M., Chi-Ham, C. L., Kulkarni, S., Lorence, A., & Bennett, A. B.** (2011). Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**(10):1244–1249.

- Horemans N., Asard H., Caubergs R.J.** (1994) The Role of Ascorbate Free Radical as an Electron Acceptor to Cytochrome b-Mediated Trans-Plasma Membrane Electron Transport in Higher Plants. *Plant Physiology* **104**:1455–1458.
- Horemans N., Foyer C.H., Asard H.** (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* **5**:263–267.
- Kato N., Esaka M.** (1999) Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia Plantarum* **105**:321–329.
- Kato N., Esaka M.** (2000) Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. *Planta* **210**:1018–1022.
- Kerchev P.I., Pellny T.K., Vivancos P.D., Kiddle G., Hedden P., Driscoll S., Vanacker H., Verrier P., Hancock R.D., Foyer C.H.** (2011) The Transcription Factor ABI4 Is Required for the Ascorbic Acid-Dependent Regulation of Growth and Regulation of Jasmonate-Dependent Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**:3319–3334.
- Kerk N.M., Jiang K., Feldman L.J.** (2000) Auxin Metabolism in the Root Apical Meristem. *Plant Physiology* **122**:925–932.
- Kim, Y. S., Kim, I. S., Bae, M. J., Choe, Y. H., Kim, Y. H., Park, H. M., ... & Yoon, H. S.** (2013). Homologous expression of cytosolic dehydroascorbate reductase increases grain yield and biomass under paddy field conditions in transgenic rice (*Oryza sativa* L. japonica). *Planta* **237**(6):1613-1625.
- Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E.,..., Steinhäuser D.** (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21**:1635–1638.
- Liso R., Calabrese G., Bitonti M.B., Arrigoni O.** (1984) Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental Cell Research* **150**:314–320.
- Lytovchenko A., Eickmeier I., Pons C., Osorio S., Szecowka M., Lehmberg K.,..., Fernie A.R.** (2011) Tomato Fruit Photosynthesis Is Seemingly Unimportant in Primary Metabolism and Ripening But Plays a Considerable Role in Seed Development. *Plant Physiology* **157**:1650–1663.
- Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**:405–410.
- Murchie E.H., Lawson T.** (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* **64**:3983–3998.
- Pallanca J.E., Smirnoff N.** (2000) The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *Journal of Experimental Botany* **51**:669–674.
- Paul M.J., Pellny T.K.** (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54**:539–547.
- Pinto M.C. de, Francis D., Gara L.D.** (1999) The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **209**:90–97.
- Poiroux-Gonord, F., Santini, J., Fanciullino, A.-L., Lopez-Lauri, F., Giannettini, J., Sallanon, H., Berti, L., Urban, L.** (2013) Metabolism in orange fruits is driven by photooxidative stress in the leaves. *Physiologia Plantarum* **149**(2):175-187.
- Potters G., Horemans N., Bellone S., Caubergs R.J., Trost P., Guisez Y., Asard H.** (2004) Dehydroascorbate Influences the Plant Cell Cycle through a Glutathione-Independent Reduction Mechanism. *Plant Physiology* **134**:1479–1487.
- Ruan Y.L., Patrick J.W.** (1995) The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* **196**:434–444.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H.** (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **177**(1):67-80.

- Sanmartin M., Drogoudi P.D., Lyons T., Pateraki I., Barnes J., Kanellis A.K.** (2003) Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**:918–928.
- Schopfer P., Liskay A., Bechtold M., Frahy G., Wagner A.** (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**:821–828.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M.** (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* **2012**:1–26.
- Smirnoff N.** (1996) BOTANICAL BRIEFING: The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany* **78**:661–669.
- Smirnoff N., Wheeler G.L.** (2000) Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**:291–314.
- Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zamir D., Causse M.** (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, cell & environment* **31**:1086–1096.
- Szarka A., Tomasskovics B., Bánhegyi G.** (2012) The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences* **13**:4458–4483.
- Veljovic-Jovanovic S.D., Pignocchi C., Noctor G., Foyer C.H.** (2001) Low Ascorbic Acid in the *vtc-1* Mutant of *Arabidopsis* Is Associated with Decreased Growth and Intracellular Redistribution of the Antioxidant System. *Plant Physiology* **127**:426–435.
- Xiang L., Li Y., Rolland F., Van den Ende W.** (2011) Neutral invertase, hexokinase and mitochondrial ROS homeostasis: Emerging links between sugar metabolism, sugar signaling and ascorbate synthesis. *Plant Signaling & Behavior* **6**:1567–1573.

Annexe au chapitre 1

L'effet d'une modification soudaine de l'intensité lumineuse a été étudié plus en détail sur une lignée témoin de tomate cerise. L'objectif est d'identifier la rapidité et la nature des réponses métaboliques de plantules soumises à une nouvelle donnée environnementale. Le métabolome représente l'ensemble des métabolites présents dans une cellule, métabolites dérivant de l'activité du protéome, lui-même dérivant du transcriptome. L'outil d'analyse du métabolome par GC-MS permet de révéler les réponses les plus rapides face à un changement de l'environnement ou un stress, bien avant que l'analyse des machineries protéomique et transcriptomique ne révèle un quelconque changement (Caldana et al., 2011; Töpfer et al., 2013). La nouvelle donnée climatique étudiée est la quantité de lumière (dans un protocole similaire à celui du **chapitre 1**). De par les liens entre son métabolisme et la quantité de la lumière perçue par les plantes, un focus particulier sur la molécule d'ascorbate est réalisé. Sa voie de biosynthèse principale (Man/Gal pathway) nécessite (i) l'activation par la lumière, (ii) mobilise au moins de 9 enzymes pour aboutir à la genèse d'une molécule d'ascorbate à partir du glucose (iii) un transport du précurseur L-galactose présent dans le cytosol (où la quasi-totalité des réactions de la voie se produisent) vers la membrane interne de la mitochondrie où la dernière enzyme de la voie (galactono-1,4-lactone déshydrogénase) est localisée (iv) un transport de la molécule d'ascorbate vers les organes/organelles actifs. Gallie (2013) suggère ainsi qu'une activation de la voie de biosynthèse de l'ascorbate n'agit sur la taille du pool d'ascorbate qu'après plusieurs heures. L'homéostasie redox de la cellule devrait être entièrement contrôlée par le processus de recyclage de l'ascorbate lors de l'apparition brusque d'un changement de l'environnement entraînant un stress oxydatif, avant que cet équilibre ne soit régulé par une augmentation de la taille du pool des antioxydants (notamment de l'ascorbate). En soumettant les plantules de tomate à une plus forte intensité lumineuse, nous souhaitons tester cette hypothèse en observant le délai nécessaire à une augmentation de la taille du pool d'ascorbate dans les feuilles.

Materials and methods

Growth conditions and experimental design

Tomato plantlets were sown in a sand and perlite mixture and acclimated in climatic chambers under low light conditions ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and watered every day with nutrient solution (pH5.8, 1.15mS). After 2 weeks, half of the plantlets were placed under high light conditions ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) for 7 days while the other half remained under low light for 7 days. Tomato plantlets were grown under short-day conditions (i.e. 8h light/16h dark) for the whole experiment. Samples were harvested before the start of the light treatment (T), and

then at midday after 1d, 2d, 3d, 4d and 7d. A more detailed sampling was performed on the first day after 1h, 2h, 4h, 6h, and 8h of light treatment. The final time point was harvested after 7 days (at midday). 6 plantlets per genotype and per condition were harvested at each time point. Leaves, stems and roots were separated, immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until further analysis.

Results

Early metabolic response to a change in light intensity

Plants have developed biochemical tools to perceive their light environment and to adjust metabolism to avoid stress and acclimate to their new light environment. Initial changes in leaf metabolites are usually observed during the first hour of intense light treatment. The metabolic profile of the short term changes corresponding to the first day of high light (1h to 8h, **Figure 1**) of high light plantlets was compared with profile of low light plantlets. High light treatment globally enhanced metabolite accumulation in tomato leaves (**Figure 1**), with few examples of compounds decreasing. Glucose and fructose increased strongly in high light. Sucrose content was highly and continuously enhanced during the first day of HL. The oxidation level of the ascorbate pool tended to increase during the first hours of HL treatment, with a decrease in dehydroascorbate content and an increase in threonate and oxalate, end-products of dehydroascorbate oxidation. Two of the photorespiratory intermediates glycine and glycerate also showed a high increase in high light plantlets. Interestingly, *myo*-inositol content decreased compared to low light, in the same way as for the amino acid hydroxylamine. The amino acid alanine and the lignin precursor shikimate (via the shikimic acid pathway) constantly increased during the first hour of high light treatment. Citric acid cycle intermediates malate and citrate but also the closely related amino acid GABA increased strongly compared to levels detected in low light plantlets.

Metabolic acclimation to high light

Following the initial metabolic modifications under high light, longer term metabolic responses and changes in growth were observed and led notably to changes in leaf anatomy as the most common adaptive response. The metabolic profile of high light plantlets was compared with the profile of low light plantlets during the 6 days following the start of high light treatment (1d to 7d at midday, **Figure 2**). Sugars (both hexoses and sucrose) increased constantly (**Figure 2**) during the high light experiment, whereas under low light, plantlets showed no accumulation of those sugars. Glycine, involved in photorespiration, was lower in high light plantlets throughout the high light treatment. Galacturonate and glucuronate, which principally accumulate in cell walls, were strongly accumulated.

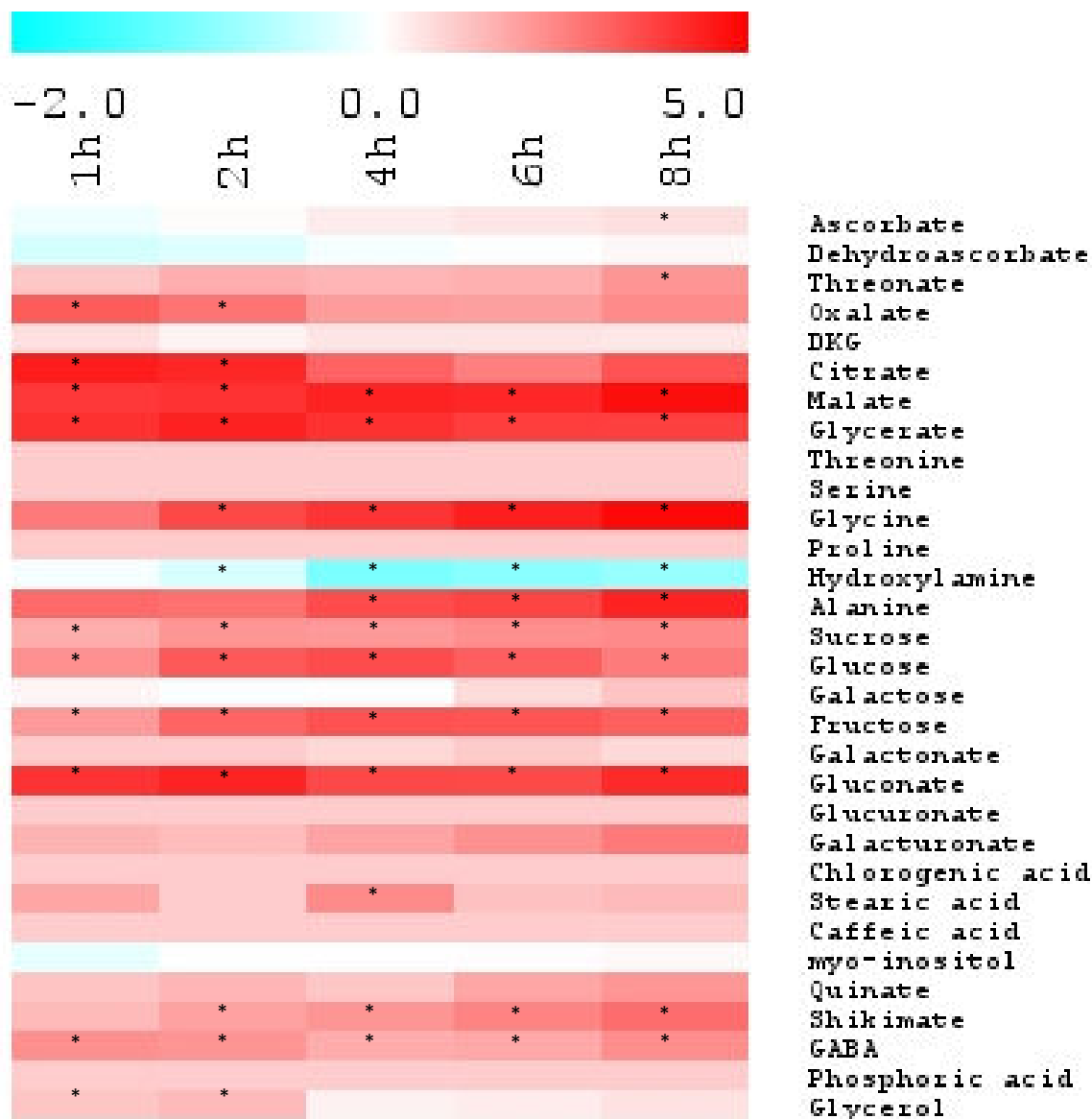


Figure 1: Early changes in metabolic profile of wild type tomato leaves shifted to high light intensity. Plantlets were sampled 1, 2, 4, 6 and 8h after initiation of high light treatment. Metabolites were detected by GC-MS analysis. Metabolite levels are expressed in arbitrary unit.gDw⁻¹ (relative concentration determined by comparison with internal standard). Heat map represents high light concentration of all metabolites relative to low light concentration for each time point. Six replicates (independent plants) per condition and time point were used. One star indicates a significant difference with the wild type (p<0.05).

Cell wall components accumulated under high light resulting in a loss of stem flexibility. Phenolic acids (shikimate and especially chlorogenic acid) increased constantly in high light to reach a maximum after 7 days of treatment. Furthermore, anthocyanin content increased under high light compared to low light in both stems and leaves of tomato plantlets (**Table 1**).

Ascorbate content is related to light intensity, in contrast to glutathione pool

The reduced and oxidized forms of ascorbate were assayed and found to be similar for plantlets under low light and high light during the 6 first hours of treatment (**Figure 3 a**). After 8 hours of treatment, ascorbate content was significantly higher in high light plantlets. Under high light, ascorbate content increased at the end of the first day and was found to be higher at midday of the second day than under low light, then it remained at similar levels for the following days (**Figure 3 b**). From the second day until the end of the experiment, ascorbate content was stable at midday whether plantlets were under high light or low light. Ascorbate content was 1.6 times higher in high light plantlets compared to the concentration of plants under low light.

Reduced and oxidized glutathione were assayed on plantlets harvested 1h or 7 days after the start of light treatment (**Table 2**). In contrast to ascorbate content, no correlation after 7 days of light treatment was found between light intensity and glutathione content as low light and high light plantlets showed similar concentrations of total glutathione. After 1h of treatment, we have noticed a significant decrease of the glutathione concentration under high light. We aim to assay total glutathione in a more detailed time-course to highlight those results (**in progress**).

Discussion

Metabolic modifications lead to acclimation to light stress

The metabolic profile of tomato plantlets under strong light stress has been revealed. We noticed that photo-respiratory intermediates increased under high light (**Figure 1**), giving us an indication that photorespiration was induced. In order to deal with these profound modifications affecting primary metabolism, we observed that sugars (notably sucrose and glucose) strongly increased in both of our experiments (**Figures 1 and 2**). Soluble sugars usually accumulated during abiotic (or biotic) stress, suggesting a potential protective role. Indeed, variations in sugar content can enhance or decrease ROS production in plant cells in a concentration dependent manner (Keunen et al., 2013). Indeed, high sugar levels improve the rate of reducing power production by feeding the pentose phosphate pathway, thus scavenging ROS (Couée et al., 2006). On the other hand, low sugar concentrations leads to

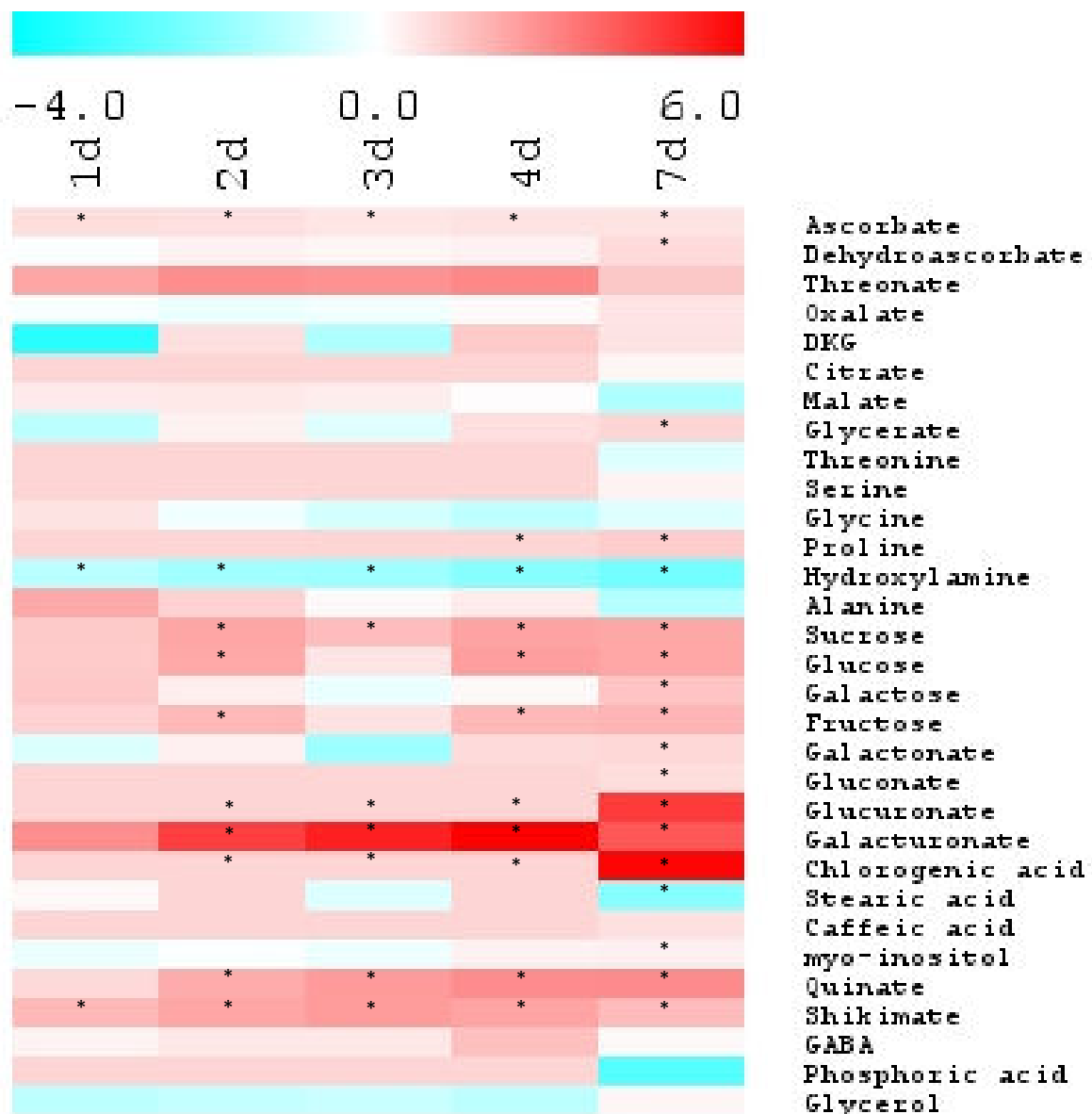


Figure 3: Metabolic acclimation of wild type tomato leaves shifted to high light intensity. Plantlets were sampled 1, 2, 3, 4 and 7d at midday after initiation of high light treatment. Metabolites were detected by GC-MS analysis. Metabolite levels are expressed in arbitrary unit.gDw⁻¹ (relative concentration determined by comparison with internal standard). Heat map represents high light concentration of all metabolites relative to low light concentration for each time point. Six replicates (independent plants) per condition and time point were used. One star indicates a significant difference with the wild type (p<0.05).

specific signaling to improve the antioxidant capacity, such as modifications of the activity of glutathione-S-transferases and superoxide dismutase (Couée et al., 2006).

Furthermore, sucrose influences ascorbate biosynthesis (Nishikawa et al., 2005) through an up-regulation of the expression of the biosynthetic-related genes by sucrose feeding. All these are indirect signals connected to ROS scavenging, but some more direct effects of sugars on ROS are also mentioned. Recently, the potential direct antioxidant role of sucrose and fructans were demonstrated *in vitro* (Peshev et al., 2013) but strong hypotheses suggest that they might also have this role in *planta* (Ende and Valluru, 2009). The relationship between sugar metabolism and abiotic stress responses is of high interest notably when considering the close links between the photosynthetic machinery, antioxidant metabolism and sugars.

The final defense components mobilized (**Figure 2**) are related to cell wall structure (galacturonate and glucuronate) and anthocyanins (**Table 1**). Strong accumulation of cell wall components leads to structural protection of cells and reveals acclimation of plantlets under high light after 7 days of treatment. Indeed, in our experiment, anthocyanin content increased dramatically under high light in stems and leaves so that it could protect photosynthetic machinery from oxidant damage. This is in agreement with previous work on anthocyanins which shows that high anthocyanin levels reduces photoinhibition in both stems and leaves (Gould et al., 2010). A linear correlation between photoprotection and anthocyanin content exists and is revealed by phenotypes observed in our experiments where tomato plantlets under oxidative stress exhibited reddish-stems and vascular veins of leaves (**supplemental data 1**). It is worth noticing that biosynthesis of anthocyanin is dependent on ascorbate (ascorbate acts as a cofactor; Page et al., 2012), so that ascorbate metabolism may play a central role in light stress response.

Ascorbate accumulation linked to biosynthesis takes 8 hours to be detected after a modification in light environment

Ascorbate content was not affected by light treatment during the first 6 hours, then it was significantly higher for high light plantlets after 8 hours of treatment until the end of the 7 days, as previously observed in green algae facing high light stress (Davis et al., 2013) and on wild type and *vtc-2* mutants in *Arabidopsis* whose results showed that ascorbate content increased dramatically within the first hours (precisely recorded after 4 hours) of high light treatment only in chloroplasts and decreased in peroxisomes (Heyneke et al., 2013). This organelle-dependent accumulation is linked to the photo-protective role of ascorbate in the chloroplasts since the electron transport chain is saturated by excess light.

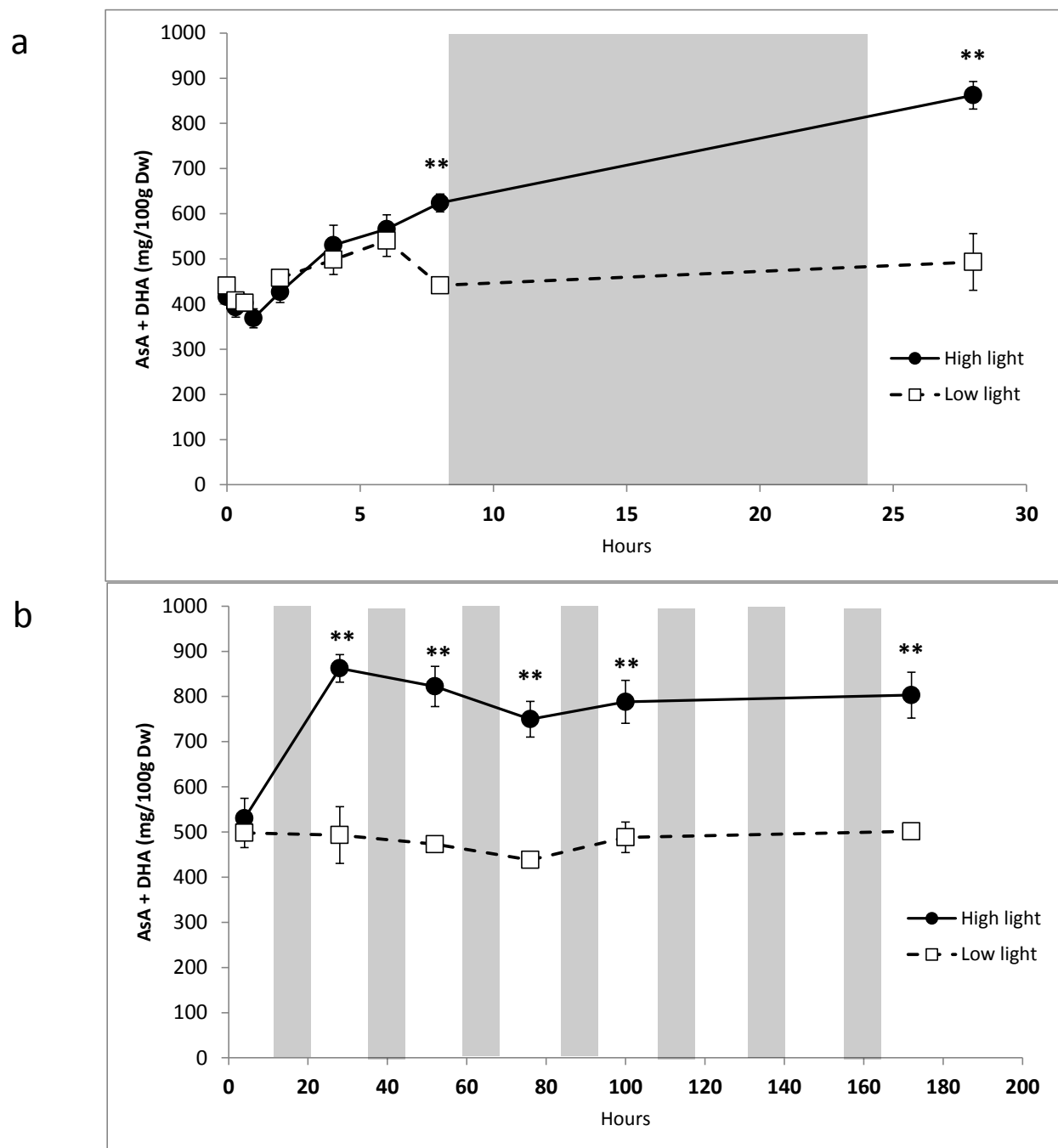


Figure 3: (a) Ascorbate pool (AsA+DHA) in young plantlets under high light (black circles) or low light (white squares) during the first day of light treatment and (b) during 7 days at midday. Data are means of 6 replicates per treatment. Two stars indicate significant differences between light treatment ($p < 0.01$). Grey stripes represent night.

	GSH + GSSG (nmol.gDw ⁻¹)			
	1h	$p < 0.05$	168h	$p < 0.05$
Low light	3226.2		3453.2	
High light	2717.7	*	3476.9	ns

Table 2: Glutathione pool (GSH+GSSG) in young plantlets under high light or low light growth conditions after 1h or 7 days of light treatment. Data are means of 6 replicates per treatment. One star indicates significant differences between light treatment ($p < 0.05$).

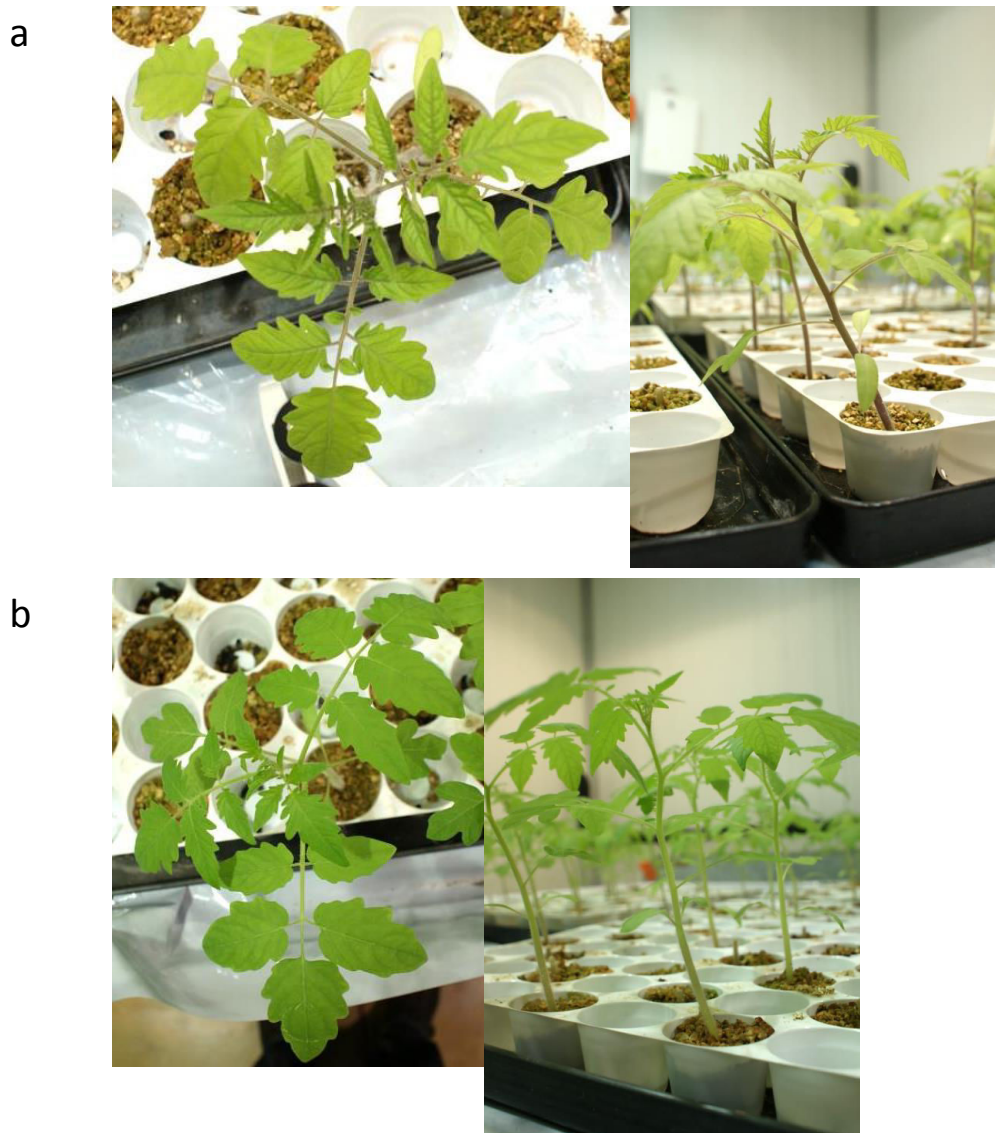
The biosynthesis pathway of ascorbate is relevant for increasing ascorbate concentration and is light-activated (Bartoli et al., 2006; Dowdle et al., 2007). This up-regulation of biosynthetic genes results in an increase of reduced ascorbate. During our experiment, we conclude that the biosynthetic pathway led to an accumulation of ascorbate after 8 hours in plantlets under high light. After 24h of treatment, ascorbate content has reached a stable state whose value corresponds to the correlation between light intensity and ascorbate content.

Ascorbate should be used to protect cells from oxidation during these first hours, so that ascorbate recycling must be efficient (Gallie, 2013). Despite the high concentration of ascorbate, we noted that threonate, a degradation product of ascorbate, accumulated slightly under oxidative stress meaning that ascorbate recycling must be efficient to minimize further oxidation of dehydroascorbate. Ascorbate's role as an antioxidant is dependent on its recycling rate during the first hours of a strong oxidative stress. MDHAR and DHAR activities will therefore be assayed.

Conclusion

Metabolomic tools are an efficient way of studying tolerance and acclimation processes used by tomato plantlets under light stress in order to measure accumulation of antioxidants and signal molecules for example. Not only the appearance and anatomy of tomato plantlets under light stress were affected but also the metabolic profile and notably ascorbate content. Given the close relationship between ascorbate metabolism and light along with the pivotal role of ascorbate in photoprotection, efficient recycling of ascorbate is critical to respond to a sudden increase in light. The establishment of a model that takes into account the biosynthetic pathway, the recycling rate and the degradation rate of ascorbate during a modification of light environment should also be considered. Therefore, additionally to these results, we aim to assay MDHAR activity and DHAR activity. We expect that recycling enzymes of ascorbate will be differentially expressed during the first hours of the high light treatment, compared to low light expression of these enzymes. Such laboratory analyses are in progress, and will be added to this chapter before publication.

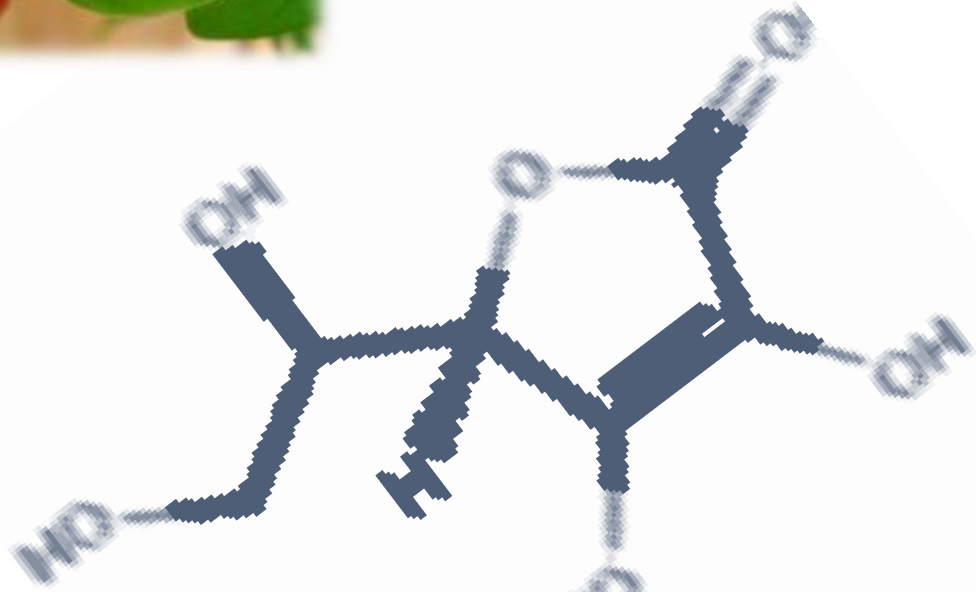
Supplemental Data



Supplemental data 1: Pictures of plantlets grown under (a) high light ($1000 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) intensity or (b) low light ($100 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) intensity for 7 days.

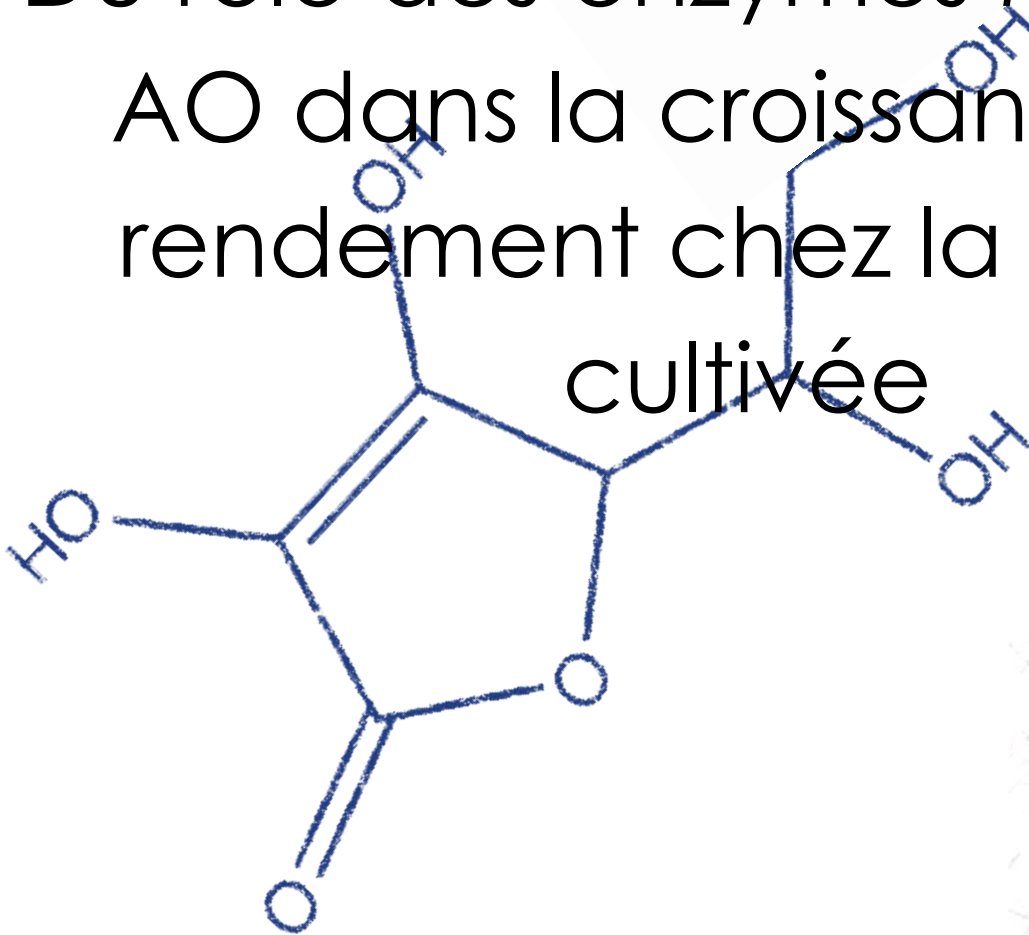
References

- Bartoli C.G., Yu J., Gómez F., Fernández L., McIntosh L., Foyer C.H.** (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**:1621–1631.
- Caldana C., Degenkolbe T., Cuadros-Inostroza A., Klie S., Sulpice R., Leisse A., Steinhauser D., Fernie A.R., Willmitzer L., Hannah M.A.** (2011) High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of *Arabidopsis* to eight environmental conditions. *The Plant Journal* **67**:869–884.
- Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., Amrani A.E.** (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**:449–459.
- Davis M.C., Fiehn O., Durnford D.G.** (2013) Metabolic acclimation to excess light intensity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, Cell & Environment* **36**:1391–1405.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnoff N.** (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-I-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* **52**:673–689.
- Ende W.V. den, Valluru R.** (2009) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany* **60**:9–18.
- Gallie D.R.** (2013) The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany* **64**:433–443.
- Gould K.S., Dudle D.A., Neufeld H.S.** (2010) Why some stems are red: cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. *Journal of Experimental Botany* **61**:2707–2717.
- Heyneke E., Luschin-Ebengreuth N., Krajcer I., Wolkinger V., Müller M., Zechmann B.** (2013) Dynamic compartment specific changes in glutathione and ascorbate levels in *Arabidopsis* plants exposed to different light intensities. *BMC Plant Biology* **13**:104.
- Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., Van Den Ende W., Cuypers A.** (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment* **36**:1242–1255.
- Nishikawa F., Kato M., Hyodo H., Ikoma Y., Sugiura M., Yano M.** (2005) Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. *Journal of Experimental Botany* **56**:65–72.
- Page M., Sultana N., Paszkiewicz K., Florance H., Smirnoff N.** (2012) The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell & Environment* **35**:388–404.
- Peshev D., Vergauwen R., Moglia A., Hideg É., Ende W.V. den** (2013) Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany* **64**:1025–1038.
- Töpfer N., Caldana C., Grimbs S., Willmitzer L., Fernie A.R., Nikoloski Z.** (2013) Integration of Genome-Scale Modeling and Transcript Profiling Reveals Metabolic Pathways Underlying Light and Temperature Acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **25**:1197–1211.



Chapitre 2

Du rôle des enzymes MDHAR et
AO dans la croissance et le
rendement chez la tomate
cultivée



Avant-propos

Dans le chapitre précédent, nous proposons que la croissance des cellules puisse être partiellement sous le contrôle du statut redox du couple ascorbate-monodéhydroascorbate à la suite d'une étude complète sur le métabolisme de lignées sur-exprimant et sous-exprimant l'activité de l'enzyme MDHAR sous différentes conditions environnementales, étude réalisée sur un génotype de tomate cerise. La tomate cerise se rapproche (génétiquement parlant) fortement de la tomate sauvage, et présente un profil de relations source-puit relativement similaire (avec peu de ressources carbonées allouées aux fruits). Nous souhaitons tester l'hypothèse (observée dans le chapitre précédent) d'un contrôle redox de la croissance par le couple AsA/MDHA dans différents fonds génétiques présentant des relations source-puit différentes, avec une forte allocation des ressources vers les fruits : sur des génotypes de tomates à gros fruits, ou dans le modèle Micro-Tom. Des modifications génétiques similaires à celles du chapitre 1 sont réalisées sur Moneymaker et Micro-Toms afin de générer des lignées sous-exprimant et sur-exprimant l'enzyme MDHAR, mais également l'enzyme AO. La relation entre l'activité de ces enzymes et la croissance et le rendement est discutée et comparée avec les résultats du chapitre précédent afin d'observer si le statut redox affecte les mêmes processus.

Les résultats sont présentés sous forme de papier et feront l'objet d'une soumission pour publication après l'obtention des derniers dosages d'activités enzymatiques.

The impact of a modification of MDHAR or AO activity on growth and yield in tomato depends on the genetic background

Abstract:

Ascorbate metabolism and growth are often closely related, notably through the radical monodehydroascorbate (MDHA). MDHA is the semi-oxidized form of ascorbate resulting from ascorbate oxidase (AO) or ascorbate peroxidase (APX) activities or non-enzymatic oxidation, and reduced by monodehydroascorbate reductase (MDHAR) activity. Previous work has revealed the correlation between MDHAR activity and yield in cherry tomato. We aim to investigate if a similar control is consistent in different genetic background of tomato, notably presenting some differences in terms of growth potential and hormonal control. The role of AO and MDHAR in the establishment of yield in large-fruited tomato was studied under optimal growth conditions or under conditions of carbon limitation and compared with previously published results on cherry tomato. Transgenic lines under-expressing MDHAR or AO were generated in Moneymaker and lines under and over expressing MDHAR in Micro-Tom. MDHAR activity was not correlated with ascorbate content. Yield was altered by a change in MDHAR activity both in Micro-Tom and Moneymaker genetic backgrounds through modifications of the number of fruits per truss, indicating a possible control of fruit set or flowering by ascorbate redox enzymes. Tolerance to carbon stress decreased in MDHAR under-expressed lines. The enzymes AO and MDHAR are therefore involved under carbon limitation in the establishment of yield in tomato, both cherry and large-fruited genotypes.

Keywords: ascorbate recycling, carbon limitation, cherry tomato, large-fruited genotypes, yield.

The redox status of plant cells strongly influences plant growth and development through the network involving reactive oxygen species, antioxidants and hormones (Bartoli et al., 2013; Considine and Foyer, 2013; Kocsy et al., 2013). As ascorbate is present in high concentrations in all cells, its redox status through the ascorbate-glutathione cycle is important in controlling the redox state of the cell. Under optimal growth conditions, ascorbate and glutathione redox couples are maintained in a highly reduced state, promoting cell division, whereas oxidizing environments inhibit cell division and promote cell differentiation. The reduced form of ascorbate (AsA) is oxidized into monodehydroascorbate (a radical; MDHA), resulting from the loss of a single electron. Dehydroascorbate (DHA) is generated from the disproportionation of the radical form or the loss of a second electron from MDHA. Oxidation can be non-enzymatic (via direct interaction with ROS) or enzymatic, for example by the action of ascorbate oxidase (AO) or ascorbate peroxidase (APX). Recycling of ascorbate is carried out by monodehydroascorbate reductase (MDHAR) which is an NADPH-dependent enzyme and dehydroascorbate reductase (DHAR) which uses glutathione as an electron donor. Ascorbate metabolism and growth (cell division and expansion) are often closely related. The reduced form of ascorbate stimulates mitosis via the G1 to S phase transition (Liso et al., 1984; Pinto et al., 1999), unlike DHA which is an inhibitor of the G1 phase (Potters et al., 2004). It has also been shown that the radical MDHA stimulates cell expansion (Gonzalez-Reyes et al., 1995). The ascorbate oxidase enzyme oxidizes reduced ascorbate into monodehydroascorbate (MDHA) and induces the transition from cell division to cell expansion (Kato et Esaka, 2000). Ascorbate oxidase shows interesting links with the growth related hormone auxin (Kerk et al., 2000). Moreover, flowering (and then fruit set) and ascorbate have been linked in numerous studies. High ascorbate content leads to a delay in flowering in *Arabidopsis*, and low ascorbate content results in early flowering (Attolico et De Tullio, 2006). However, these differences in terms of flowering time are also dependent on day length. Indeed, in *vtc1* mutants (with low ascorbate content), flowering time is earlier when days are long and delayed in short-days (Kotchoni et al., 2009). Furthermore, as flowering time could be initiated by signals such as H₂O₂, the enzyme ascorbate peroxidase (whose activity leads to H₂O₂ scavenging) represents another link between ascorbate metabolism and flowering (Chai et al., 2014; Z. Ye et al., 2000). From all these studies, we can affirm that ascorbate metabolism plays a central role in fruit size and also fruit number, as it results from flowering and fruit set. As yield is driven by fruit weight and fruit number, a better understanding of ascorbate redox control on these growth processes will be useful for basic yield control in the field.

It has already been shown that silencing of ascorbate oxidase activity improves yield in cherry tomato under unfavorable conditions (Garchery et al., 2013).

Moreover, in rice, overexpression of DHAR leads to an improvement in terms of yield and biomass but also to a better tolerance to environmental stress in the field due to higher ascorbate content and a more reducing state of the ascorbate pool through the co-activation of MDHAR, APX and GR (Kim et al., 2013). High ascorbate content resulting from overexpression of the biosynthetic pathway genes also leads to positive effects on growth and biomass in *Arabidopsis* (Lisko et al., 2013). In cherry tomato, we have also shown that yield and vegetative growth could be altered by reducing MDHAR activity under optimal growth conditions and more pronounced effects are seen under carbon limitation (Truffault, submitted). These observations give us new evidence of a network involving ascorbate recycling, sugar metabolism and growth processes.

Domestication has increased the harvest index of many crops, including tomato (Tanksley, 2004), and in tomato has led to larger-fruited genotypes with increases in locule number and cell division (Cong et al., 2002; Frary et al., 2000). Cherry tomatoes represent an intermediate type of tomato between cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) and the closest wild ancestor (*Solanum pimpinellifolium*) and are probably the first domesticated form (Nesbitt et Tanksley, 2002; Ranc et al., 2008). Approximately 30% of the difference in terms of fruit weight and size between small and large-fruited genotypes is related to only one QTL, fw2.2, which negatively controls cell division in tomato fruit (Frary et al., 2000). This increase in yield has often been at the expense of dry matter and antioxidant content leading to, for example, lower ascorbate content (Gest et al., 2013b; Stevens et al., 2007). We wanted to see if the effects on yield seen in cherry tomato (Truffault, submitted) were also present in large-fruited cultivated genotypes such as Moneymaker. Therefore, we performed a study on the impact of a modified ascorbate recycling in Moneymaker, under different growth conditions (either under carbon limitation or under optimal growth conditions). We also studied modified ascorbate recycling in Micro-Tom, a model plant for hormone regulation of tomato fruit development and growth (Carvalho et al., 2011; Just et al., 2013; Serrani et al., 2007) and evaluated the effect of gene silencing in different organs. We were also able to use this material to evaluate the correlation between the expression of this gene and ascorbate concentrations, as a negative feedback has been previously mentioned by Gest et al., (2013a) in a different genotype.

Materials and methods

Plant material

Solanum lycopersicum L. variety Moneymaker cotyledons were transformed as previously described by Gest et al., 2013a. The independent lines under-expressing MDHAR used in this paper were mds1MK to mds30MK (MNK MDHAR). Plants under-expressing AO were labelled ao2MK to ao22MK (MNK AO). Lines studied were from the T1 generation, selected

on kanamycin and were heterozygous or homozygous for the transgene. Wild type plants were used as reference (MK1 and MK2).

Miniature tomato cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) was also transformed using previously described constructs: independent lines under-expressing total MDHAR activity were labelled 1mds and 19mds, whereas over-expressing lines were labelled 2sx and 12sx and 29sx. Lines where MDHAR activity was decreased only in fruit (2pmd-a and 2pmd-b independent lines) were generated by cloning the same fragment as used in the RNAi lines into an RNAi vector where the 35S promoter was replaced by a fruit-specific promoter (PEPC). This specific promoter is a valid candidate to study specific expression in tomato fruit, as described previously (Guillet et al., 2012). Micro-Tom wild type was used as reference (μ T).

Growth conditions and experimental design

Tomato Moneymaker plants were grown in a greenhouse in Autumn in accordance with commercial practices in terms of plant nutrition, pest control and water supply. Micro-Tom seeds were sown in a sand and perlite mixture and grown in climatic chambers in optimal growth conditions (light conditions $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ under short-days (i.e. 8h light/16h dark) watered every day with nutrient solution at pH5.8, 1.15mS). Flowers were mechanically pollinated three times a week and side shoots removed as they appeared. Total fruit yield of Moneymaker and Micro-Tom plants was estimated by a precise counting of the number of fruit per truss and weight of the fruits. For the leaf removal experiment with Moneymaker, only 1 leaf was kept per truss, other leaves were removed (see **Supplemental data 1**). 6 plants per condition and genotype were used as replicates. Small fruits aged 20 days after anthesis and orange fruits of Moneymaker were harvested and immediately frozen and stored at -80°C before grinding.

Assay of MDHAR enzyme activity

The assay of the activity of MDHAR enzyme was based on the oxidation of NADH at 30°C . Extractions were performed on ground powder conserved at -80°C in 600 μl of 50mM Tris-HCl at pH7.8. 50 μl of extracts were mixed with 1ml of 1mM ascorbate, 0.2mM NADH and enough ascorbate oxidase enzyme to give a linear production of MDHA radical. Measurements were performed at 340nm in triplicate. Measures of MDHAR activity represent the sum of activities of different MDHAR isoforms.

Assay of AO enzyme activity

Total ascorbate oxidase activity was measured based on a previously described method (Pignocchi et al., 2003). Leaf material (50mg) was homogenized with 0.1M sodium phosphate at pH5.6, 0.5mM EDTA. Then 100µl of extract were assayed rapidly at 265 nm in a final volume of 1ml containing 0.1mM ascorbate in the same phosphate buffer. The absorbance decrease at 265nm was followed on addition of the extract.

Ascorbate content

Measurements of ascorbic acid content were carried out as described (Stevens et al., 2006). Extractions were performed on ground powder conserved at -80°C in ice-cold 6% TCA. Spectrophotometric assay was based on the detection of dipyriddy-Fe²⁺ complexes following the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ by the reduced form of ascorbate present in the sample. Total ascorbate content (reduced + oxidized forms) was measured by mixing the sample with 5mM DTT to reduce DHA, prior to the assay. Each extract was measured in duplicate. The specificity of the assay has been checked by comparison with other known methods (Stevens et al., 2006) and by using ascorbate oxidase to remove all ascorbate in order to detect and deduce background ascorbate.

Sugar assay

Measurements of glucose, fructose and sucrose were performed by HPLC, as previously described (Gomez et al., 2002). Sugars were extracted in a methanol:chloroform:water mixture (1/0.6/1) at 4°C. Polyvinylpyrrolidone was used to trap phenols and extracts were then purified before quantitative analysis.

Statistical analysis

Data were submitted to a two (or three) way analysis of variance (ANOVA) by taking into account the effect of the genotype and the environment (and fruit development stage) and their interactions using XLStat software. Significant differences between treatments were assessed by a Fisher's test (one star for p<0.05 and two stars for p<0.01).

Results

Activity of ascorbate recycling enzymes is modified in MNK AO, MNK MDHAR and Micro-Tom modified lines

MDHAR activity was assayed on young leaves of plantlets of Moneymaker (MNK) MDHAR silenced lines (mds2MK, mds3MK, mds6MK, mds25MK, mds26MK, and mds29MK, T1 lines) and compared to wild type (MK). MDHAR activity was reduced (by over 50% for mds26MK) in MNK MDHAR silenced lines (**Table 1 a**).

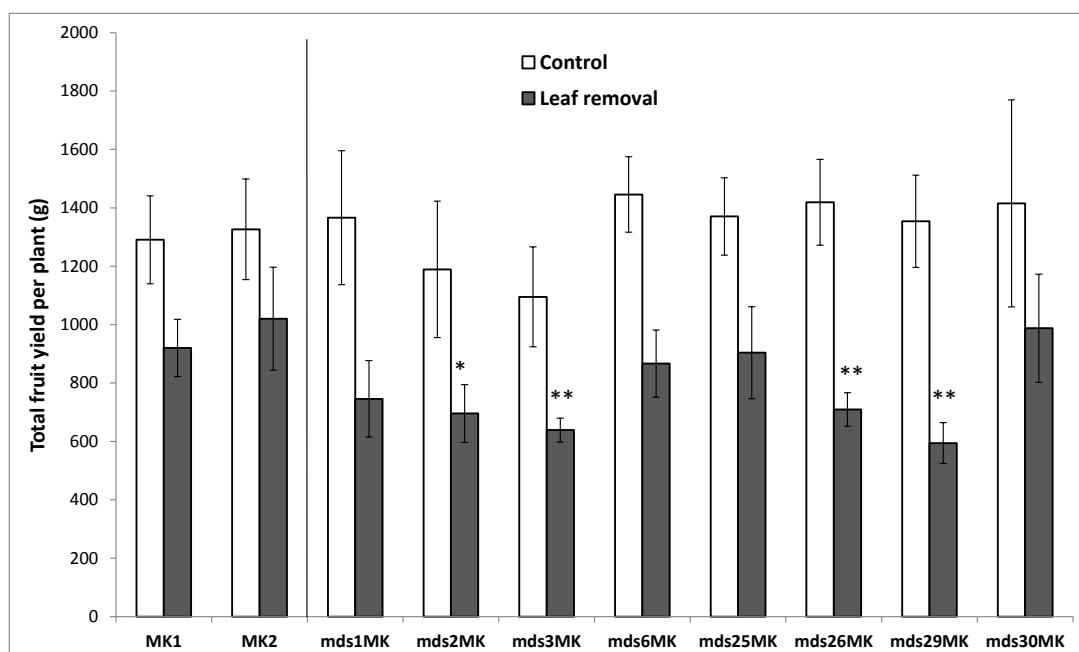
a)			b)		
$\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ of Fw			$\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ of Fw		
Moneymaker	MDHAR activity	<i>p</i>	Micro-Tom	MDHAR activity	<i>p</i>
MK	0.158		μT	0.539	
mds2MK	0.088	*	1mds	0.141	**
mds3MK	0.154	ns	19mds	0.106	**
mds6MK	0.084	*	29sx	2.048	**
mds25MK	0.082	*	2sx	2.338	**
mds26MK	0.075	*	12sx	3.630	**
mds29MK	0.103	*	2pmd-a	0.095	**
			2pmd-b	0.108	**

Table 1: (a) MDHAR activity measured in 21-day-old Moneymaker plantlets. Wild type (MK) and MDHAR silenced lines (mds2MK to mds29MK) plantlets were grown in a greenhouse in Spring. 6 plantlets per genotype were used as replicates.

(b) MDHAR activity in Micro-Tom fruits harvested at maturity in Spring. MDHAR modified lines are 1mds and 19mds (silenced lines), 2pmd-a and 2pmd-b (fruit silencing promoter), 29sx, 2sx and 12sx (overexpressing lines) and wild type (μT).

MDHAR activity is expressed in $\mu\text{mol NADH.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ of Fw. Two stars indicate significant difference compared to wild type ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$).

a



b

		Fruit weight (g)																	
		MK1	MK2	mds1MK	P	mds2MK	P	mds3MK	P	mds6MK	P	mds25MK	P	mds26MK	P	mds29MK	P	mds30MK	P
Control		53.7	50.8	43.6	ns	44.3	ns	36.9	**	37.9	*	45.8	ns	38.6	*	48.5	ns	45.0	ns
Leaf removal		43.6	46.0	45.8	ns	46.3	ns	57.4	ns	38.1	ns	42.0	ns	35.9	ns	46.5	ns	39.6	ns
		Number of fruit per truss																	
Control		24.2	26.2	31.5	ns	27.7	ns	29.7	ns	38.2	**	30.5	ns	37.0	**	27.7	ns	30,0	ns
Leaf removal		23.0	23.2	16.5	ns	15.5	ns	14.0	ns	24.5	ns	23.5	ns	20.2	ns	12.7	*	25.5	ns

Figure 1: (a) Total fruit yield per plant (in grams) on 6 trusses in Autumn (b) number of fruit per truss and fruit weight (in grams) of Moneymaker MDHAR silenced lines (mds1MK to mds30MK) and references (MK1 and MK2) under normal growth condition (white bars) or stress condition (black bars). Stress treatment consists in a 2/3 leaf removal. 6 plants per genotype and per conditions were used. Two black stars indicates significant differences with references ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$).

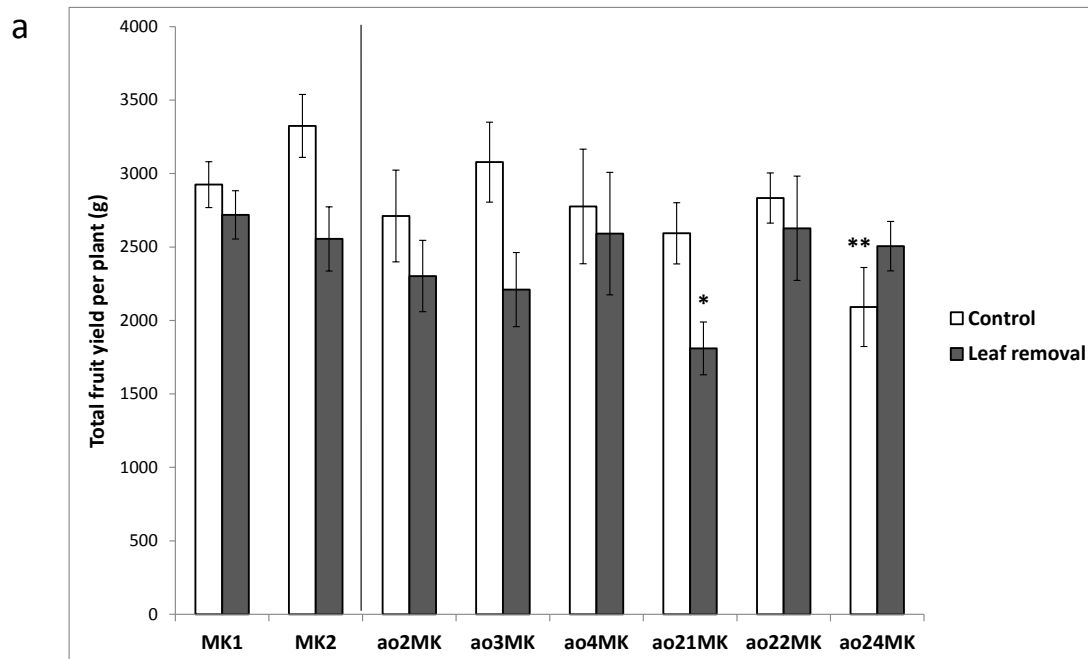
MDHAR activity of transgenic Micro-Tom lines was also assayed. Micro-Tom MDHAR silenced lines showed a reduced MDHAR activity in fruit (**Table 1 b**; MDHAR activity in leaves is in progress); whereas over-expressing lines (2sx and 12sx and 29sx) showed an increase (up to 7-fold). Using a fruit-specific promoter to silence MDHAR, we expect to confirm that the phenotype was linked to the specific role of MDHAR activity in fruit, if we determine that MDHAR activity was only reduced in fruits in these lines, not in leaves (**in progress**).

Ascorbate oxidase activity will be assayed on plantlets of Moneymaker AO silenced lines (ao2MK to ao24MK) to ensure that AO activity was reduced in MNK AO silenced lines compared to wild type AO activity (**in progress**).

MDHAR silencing affects fruit number but only affects yield under conditions of source limitation

Total fresh-weight yield of MNK MDHAR silenced lines was similar to wild type yield under optimal growth conditions (**Figure 1 a**). However, fruit weight of mds3MK, mds6MK and mds26MK was lower than for wild type, but this reduction did not lead to differences in terms of yield, due to an increase in the number of fruits per truss (**Figure 1 b**). These observations tended to be confirmed by other independent lines, thus MNK MDHAR silenced lines showed a reduced fruit weight offset by an increasing number of fruits per truss as yield was maintained. Under carbon limitation, which consists in leaf removal (removal of 2 out of 3 leaves), yield was reduced for all lines, and 4 independent lines (mds2MK, mds3MK, mds26MK and mds29MK) showed a significantly lower yield compared to wild type. Under such carbon stress conditions, fruit weight was not significantly different between MNK MDHAR silenced lines and wild type. The number of fruits per truss decreased in mds2MK, mds3MK, mds26MK and mds29MK, as 13 to 20 fruits per truss were counted for these lines, in comparison to 23 fruits per truss for wild type (MK1 and MK2).

Total fruit yield of MNK AO silenced lines was surveyed under optimal growth conditions and under carbon limitation as described above. Under normal growth conditions, MNK AO silenced line labelled ao24MK was the only line showing differences in term of yield with the wild type (**Figure 2 a**), due to a reduced fruit weight (**Figure 2 b**). Under carbon stress situation, ao21MK had a decreased yield due to a combination of a lower fruit weight and a reduced number of fruits per truss. Except for these two lines, no clear tendency could be highlighted between MNK AO silenced lines and wild type.



b

Fruit weight (g)														
	MK1	MK2	ao2MK	<i>p</i>	ao3MK	<i>p</i>	ao4MK	<i>p</i>	ao21MK	<i>p</i>	ao22MK	<i>p</i>	ao24MK	<i>p</i>
Control	73.6	76.3	63.8	ns	74.6	ns	55.9	*	64.6	ns	75.9	ns	52.0	**
Leaf removal	68.4	64.9	60.6	ns	56.0	ns	68.6	ns	55.0	ns	75.9	ns	62.7	ns
Number of fruit per truss														
Control	40.8	44.5	43.5	ns	42.6	ns	52.7	*	41.0	ns	38.0	ns	40.2	ns
Leaf removal	40.2	40.5	41.0	ns	39.3	ns	39.5	ns	32.0	ns	36.0	ns	42.7	ns

Figure 2: (a) Total fruit yield per plant (in grams) on 5 trusses in Spring (b) number of fruit per truss and fruit weight (in grams) of Moneymaker AO silenced lines (ao2MK to ao24MK) and references (MK1 and MK2) under normal growth condition (white bars) or stress condition (black bars). Stress treatment consists in a 2/3 leaf removal. 6 plants per genotype and per conditions were used. Two black stars indicates significant differences with references ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$).

In Micro-Tom, modification of MDHAR activity induces changes in yield through alteration of the number of fruits

Total fruit yield per plant was decreased in Micro-Tom under-expressed lines and also for two of the three independent lines of Micro-Tom over-expressing lines (**Figure 3 a**). However, lines where MDHAR activity was reduced in fruit only exhibited similar yield to wild type. The number of fruits per truss was largely affected by modified MDHAR activity. Indeed, the number of fruits was decreased for one Micro-Tom silenced line (1mds), one fruit silencing promoter line (2pmd-b) but also for over-expressing lines, with the largest decrease for the 29sx line (**Figure 4 c**). Fruit weight increased in two of the over-expressing lines (2sx and 29sx).

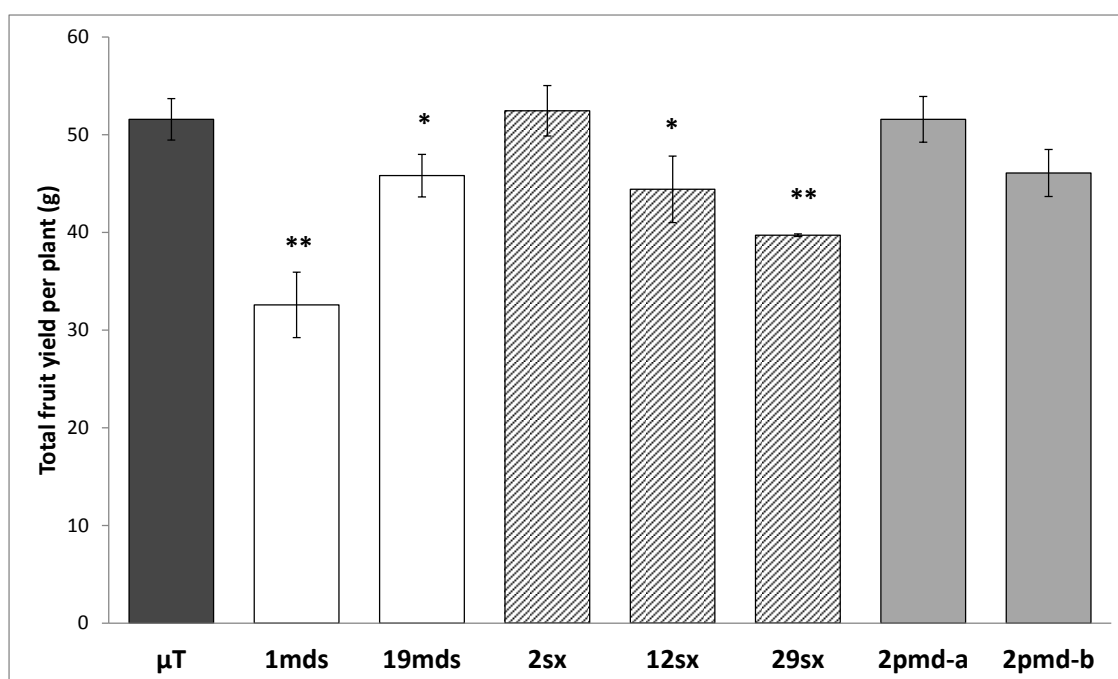
MDHAR activity slightly influences ascorbate content in leaves and in young fruits

The influence of MDHAR activity on the ascorbate pool was observed during a sunny day in leaves of the Moneymaker transgenic lines (**Figure 4 a and b**). Ascorbate content was quite stable throughout the day for wild type (MK1 and MK2). In contrast, in MNK MDHAR silenced lines, reduced ascorbate content showed an increase at midday for at least 2 independent lines, mds6MK and mds30MK (**Figure 4 a**). These lines showed no difference with the wild type at the beginning and at the end of the day in terms of ascorbate content. No difference in dehydroascorbate (DHA) content was observed between lines (**Figure 4 b**). DHA did not vary over the course of the day, even if the concentration was slightly higher at midday, as observed for the reduced ascorbate profile. We also surveyed ascorbate content in MNK fruits at two different ripening stages (young fruits 20 days after anthesis and orange fruits). Reduced MDHAR activity induced a slight decrease in ascorbate content but only in young fruits and not in orange fruits (**Table 2 a**).

As for the Micro-Tom transgenic lines, we showed in mature red fruits that silenced lines and fruit silencing promoter lines tended to have a higher ascorbate content and overexpressed lines a lower ascorbate content, although no significant changes could be noted (**Table 2 b**).

We are currently checking the influence of ascorbate oxidase activity in MNK AO silenced lines on ascorbate content (**in progress**).

a



b

	μT	1mds	p	19mds	p	2sx	p	12sx	p	29sx	p	2pmd-a	p	2pmd-b	p
Fruit weight (g)	2.7	2.3	ns	2.8	ns	3.8	**	2.8	ns	3.4	*	2.4	ns	2.8	ns
Number of fruit per truss	20.3	16.0	**	18.5	ns	16.2	**	16.2	**	12.3	**	21.7	ns	16.8	*

Figure 3: (a) Total fruit yield per plant (in grams) harvested at maturity and (b) number of fruit per truss and fruit weight (in grams) of Micro-Tom MDHAR silenced lines (1mds and 19mds, represented in white bars), overexpressing lines (29sx, 2sx and 12sx, in hatched bars), fruit promoter lines (2pmd-a and 2pmd-b, in grey bars) and wild type (μT, in black bar) grown under optimal growth conditions. 6 plants per genotype were used. Two black stars indicate significant differences with references ($p < 0.01$), one star ($p < 0.05$).

Discussion

The number of fruit per truss is affected by MDHAR activity

Previously we showed that slower early growth and a decrease in yield were observed in MDHAR silenced lines in a cherry tomato background. Such phenotypes were more pronounced under carbon limitation. We proposed that the reduced ascorbate and monodehydroascorbate couple might be involved in redox control of growth in cherry tomato, through sugar and hormone metabolisms. We therefore investigated such control in a similar study with a large-fruited genotype, Moneymaker. We could not detect any vegetative growth phenotype whether MNK MDHAR silenced lines or MNK AO silenced lines plants were growing under optimal growth conditions or stress conditions (**Supplemental data 2**). Also, yield was not different from wild type under normal growth conditions for both MNK MDHAR and MNK AO silenced lines (**Figure 1 and 2**). What is particularly interesting is that fruit set (or perhaps due to a change in the flower number per truss, **in progress**) was altered in MNK MDHAR silenced lines. We observed an increase of the number of fruits per truss at the cost of fruit weight, leading to no change in terms of total fruit yield per plant (**Figure 1**) under normal growing conditions where plants were left untouched. Under carbon stress, a reduction in the number of fruit per truss was related to a decreasing yield as fruit weight did not change for the MDHAR underexpressing lines. In the case of MNK AO silenced lines, we did not notice any modifications in term of yield, number of fruits per truss or fruit weight (**Figure 2**). These observations lead to some different explanations than those noted with cherry tomato AO and MDHAR silenced lines (Garchery et al., 2013; Gest et al., 2013a). We had hypothesized that in cherry tomato MDHAR silencing led to reduced growth of sink organs (fruits and roots) because they did not receive enough carbon from source organs (photosynthetic leaves). Indeed, in the present study, enough assimilates are present in MNK MDHAR silenced lines to maintain fruit set as the number of fruits per truss increases, even if final fruit weight decreases, so that yield per plant still remains similar to wild type. This observation is confirmed by sugar content analyses (**Supplemental data 3**), where no change in soluble sugars profile was noticed in fruit. Sugar influx to the fruit therefore does not explain the decreasing fruit weight in MNK MDHAR silenced lines: one hypothesis is that the competition within the truss increases due to a higher number of fruits per truss. Flowers were hand-pollinated so that pollination was perfectly ensured. Fruit set and development might be disturbed in MNK MDHAR silenced lines and it is well known that auxin and gibberellin can regulate fruit set and development (De Jong et al., 2009a, 2009b). Ascorbate metabolism could be involved in fruit set (Attolico et De Tullio, 2006; Kotchoni et al., 2009), through its cofactor activity during the biosynthesis of gibberellin and auxin (Pastori et al., 2003).

Redox control of auxin and gibberellin biosynthesis is particularly under control of the ascorbate redox status. In the case of our MNK MDHAR silenced lines, the redox status could be altered and affect biosynthesis of hormones. The redox changes influence growth and development but also tolerance to stress so that metabolism of MDHAR and AO silenced lines was studied under conditions where carbon was limiting in order to highlight potential phenotypes unseen under optimal growth conditions.

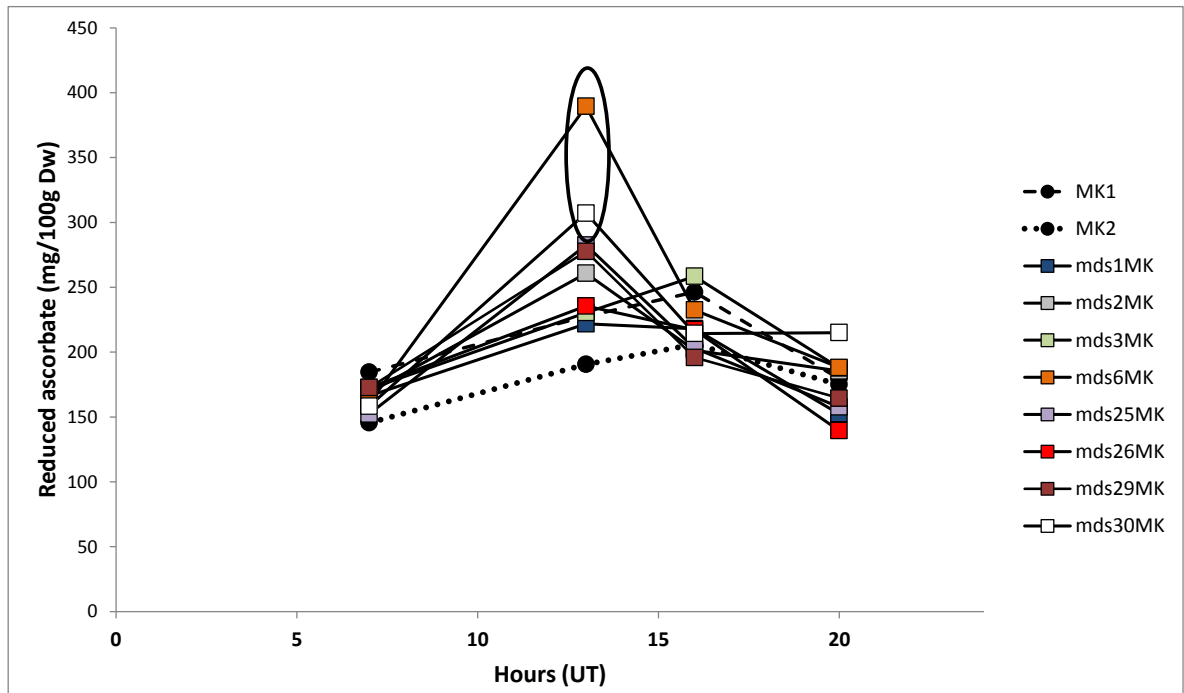
Tolerance to carbon stress decreases in MDHAR silenced lines, not in AO silenced lines

In Moneymaker, we observed that MDHAR silencing induces a more severe decrease in yield under carbon limitation than the yield reduction observed for wild type. MNK MDHAR silenced lines were not able to respond to carbon limitation (**Supplemental data 4**). In contrast, AO silencing does not affect plant response to carbon stress as yield was similar to the wild type under leaf removal conditions. Under optimal growth conditions, DHAR activity is 4-fold higher than MDHAR activity in tomato leaves (Ioannidi et al., 2009) but MDHAR activity shows an increase under stress conditions. Moreover, MDHAR activity is correlated to tolerance to chilling (Stevens et al., 2008; Tsaniklidis et al., 2014) maybe through its protective role of the glutathione pool (Airaj et al., 2013). Under carbon limitation, cherry tomato AO silenced lines showed higher tolerance to drought (Garchery et al., 2013), in contrast to cherry tomato MDHAR silenced lines (Truffault, submitted). Such conclusions are also consistent for the Moneymaker cultivar. Indeed, MNK MDHAR silenced lines were clearly affected by carbon stress whereas MNK AO silenced lines showed no yield perturbation. These observations confirm that MDHAR activity plays an important role in stress responses and yield.

MDHAR modified activity in leaves of Micro-Tom results in decrease in yield

Due to its small size and short reproductive cycle, Micro-Tom is particularly suitable for research on fruit set and fruit growth (Carvalho et al., 2011; Just et al., 2013; Serrani et al., 2007). From previous experiments, we suggest that MDHAR activity may affect fruit set in Moneymaker, so that, using Micro-Tom as a model, we investigated this hypothesis. During our experiment with Micro-Tom, we noticed that yield was decreased for both MDHAR under-expressed lines and over-expressing lines, through changes of the number of fruits per truss (**Figure 3**). Thus, the sink strength was lower resulting in a decreasing yield. Interestingly, fruit weight was slightly increased for Micro-Tom over-expressing lines, and also presented heart-shaped fruit, compared to round-fruited wild type and under-expressed lines (**Supplemental data 5**). These observations are comparable with auxin-mutants previously studied (Sagar et al., 2013).

a



b

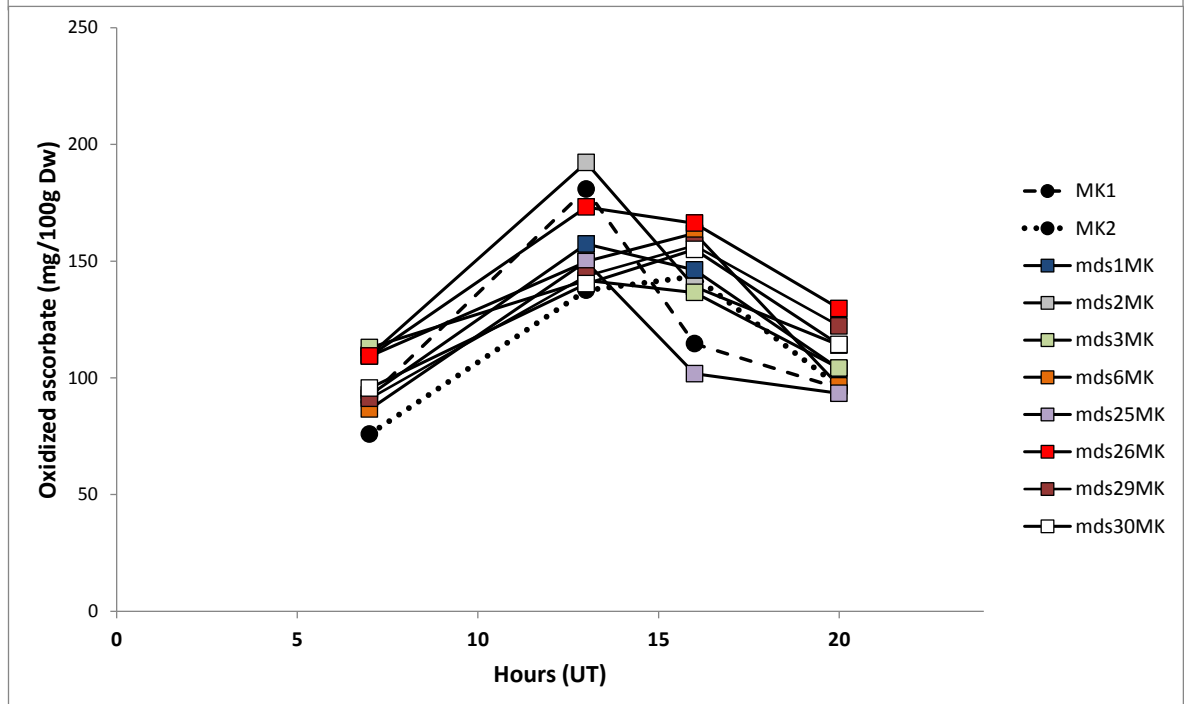


Figure 4: (a) Reduced ascorbate content and (b) dehydroascorbate content assayed in tomato leaves of Moneymaker wild type (MK1 and MK2, represented as black circles) and MDHAR silenced lines (mds1MK to mds30MK, represented as squares) during diurnal experiment in Autumn. Results expressed in mg of ascorbate per 100g of dry weight. 6 replicates per genotype and time point were used. Significant differences in reduced ascorbate content with the wild type exist for mds6MK ($p < 0.05$) and mds30MK ($p < 0.1$) at 13h.

a	<i>Reduced ascorbate (mg/100g Dw)</i>				b	<i>AsA +DHA (mg/100gFw)</i>	
	20DAA	<i>p</i>	Orange	<i>p</i>		Red fruits	<i>p</i>
MK	176.3		135.8		μT	36.92	
mds2MK	156.9	.	156.4	ns	mds	39.10	ns
mds6MK	156.9	.	138.4	ns	sx	33.14	ns
mds25MK	156.3	.	157.8	ns	pmd	39.17	ns
mds26MK	146.3	.	148.1	ns			

Table 2: (a) Reduced ascorbate content measured in tomato fruits of Moneymaker wild type (MK1 and MK2) and MDHAR silenced lines (mds2MK to mds26MK) at different ripening stages (20 days after anthesis and orange fruits). Fruits were harvested at midday in Autumn. 5 fruits per ripening stage were used as replicates.

(b) Ascorbate content (both oxidized and reduced form) in mature red fruits of Micro-Tom mds (silenced lines), sx (overexpressing lines), pmd (fruit silencing promoter lines) and wild type (μT). Fruits were harvested in Spring. 4 fruits were used as replicates.

Results are expressed in mg of ascorbate per 100g of dry weight. One point indicates significant differences compared to wild type ($p < 0.1$).

Indeed, Micro-Tom auxin mutants exhibit heart-shaped fruit too and also altered fruit size and fruit set (Su et al., 2014) indicating an essential role for auxin in such processes. Our Micro-Tom modified lines showed similar results in terms of yield and fruit forms, leading to the conclusion that close links may exist between MDHAR activity and hormone metabolism.

Interestingly, Micro-Tom overexpressing lines also exhibit a delayed flowering in greenhouse conditions in Spring (**data not shown**) and it gives us new evidence of the relationship between ascorbate and flowering time through interesting links with hormones (Barth et al., 2006). Furthermore, fruit silencing of MDHAR activity (2pmd-a and 2pmd-b lines) does not lead to a decrease in yield (**Figure 3**), in contrast to a total silencing of MDHAR activity (1mds and 19mds lines). Such observation reveals that yield and MDHAR activity in leaves are more likely to be linked than fruit MDHAR activity. Indeed, auxin biosynthesis could take place in leaves, cotyledons and roots (Woodward and Bartel, 2005) but most of the biosynthesis is ensured by young leaves (Ljung et al., 2001), probably under control of MDHAR activity.

MDHAR activity and ascorbate content show a weak correlation

Ascorbate recycling is particularly linked to stress responses and also to growth as summarized by (Gallie, 2013). The ascorbate biosynthesis pathway is responsible for the accumulation of ascorbate in cells, but over a time-scale of several hours (Bartoli et al., 2006). The improvement of ascorbate recycling by genetic tools has been well studied as efficient recycling might be the key to adapt to sudden changes in the environment. MDHAR is important as the enzyme is localized in multiple cellular compartments (Gest et al., 2013a) and its activity allows quick recycling of the radical MDHA into reduced ascorbate. Oxidative stress in plants often involves single electron oxidation, MDHAR activity is then required to prevent disproportionation of MDHA into DHA, thus protecting the glutathione pool if DHAR is not used. In previous experiments (Gest et al., 2013a), in a light-dependent manner, we revealed that a negative correlation between MDHAR activity and ascorbate content exists in cherry tomato in both leaves and fruits, as also been described by (Ren et al., 2014). In the present study, we analyzed potential negative control of the ascorbate pool by MDHAR activity in Moneymaker, which is a large-fruited cultivar. MDHAR activity was reduced in Moneymaker (**Table 1**) but no correlation between MDHAR activity and ascorbate content was noticed (**Figure 4 and Table 2**), in contrast to cherry tomato experiments. Indeed, ascorbate content was positively correlated with MDHAR activity in young fruits only (**Table 2**). Ascorbate content in leaves and mature fruits showed no relationship with MDHAR activity under optimal growth conditions. In Micro-Tom cultivar, no correlation between MDHAR activity and ascorbate content exists in fruits (**Table 2**). These observations are

consistent with previous studies (Eltelib et al., 2011; Haroldsen et al., 2011; Ren et al., 2014) revealing that relationship between MDHAR activity and ascorbate content is still controversial. As for the DHAR activity, it seems to be correlated to ascorbate content in tobacco, maize, potato and *Arabidopsis* (Chen et al., 2003; Qin et al., 2011; Wang et al., 2010) but not in tomato (Haroldsen et al., 2011) under normal growth conditions.

MDHAR influence on ascorbate content still remains unclear as ascorbate content is related to MDHAR activity in young fruits, but not in mature fruits of Moneymaker and Micro-Tom cultivars. In contrast, a negative correlation of MDHAR activity on ascorbate content in leaves may exists in Moneymaker, as it was revealed in cherry tomato (Gest et al., 2013a).

Conclusion

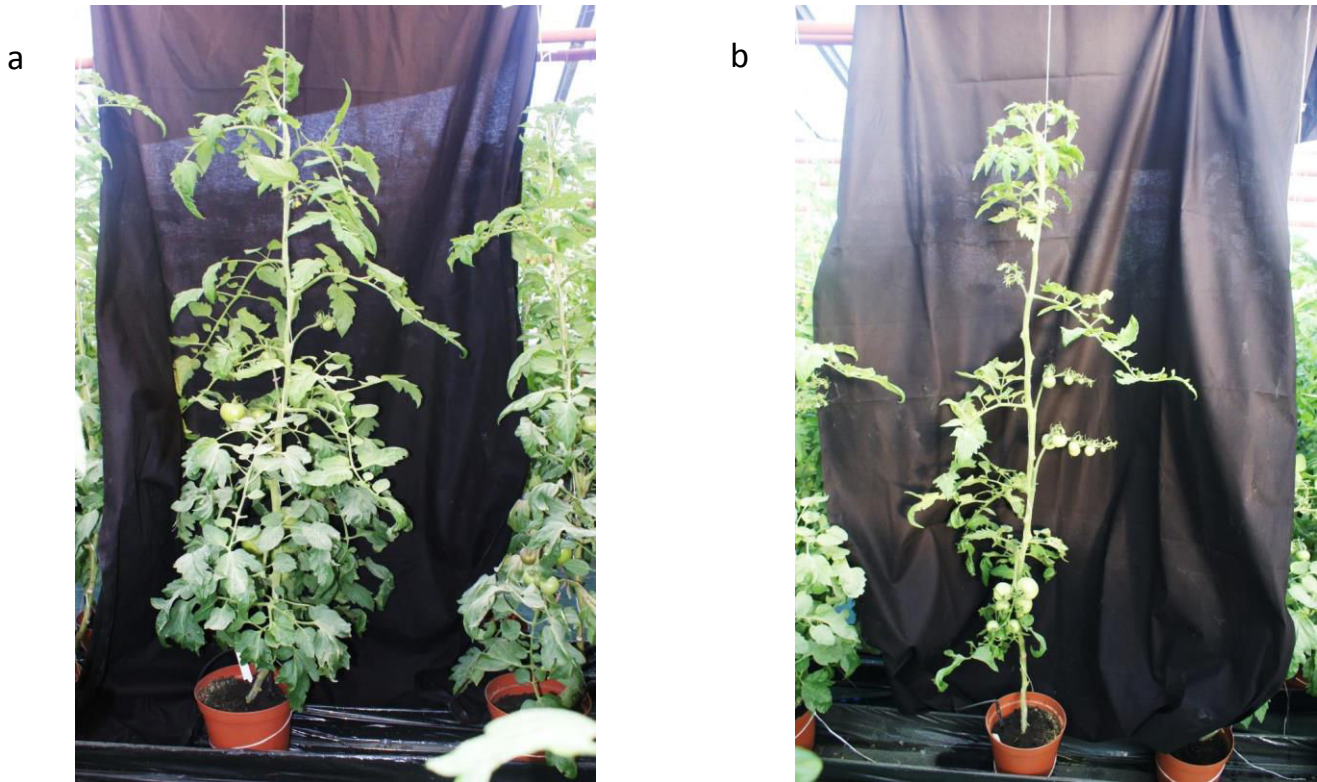
We observed that yield was largely affected by MDHAR activity in leaves of Micro-Tom, and also in Moneymaker cultivar under carbon limitation, through adjustment of the number of fruits notably. Fruit set or flowering might be disturbed and further analysis will be performed to investigate the impact of a modification in ascorbate recycling on flowering by a precise counting of the number of flower and of the flowering time. Recent work proposed that redox control of growth in cherry tomato could be regulated by the AsA/MDHA couple and impacted sugar accumulation and partitioning (Truffault, submitted) but has not been confirmed in large fruited cultivar Moneymaker nor in Micro-Tom cultivar as assimilate supply was not affected. Nevertheless; we can affirm that MDHAR/AO enzyme couple plays a crucial role under stress conditions in the establishment of yield both in cherry tomato and in large-fruited genotypes. Further studies will be necessary to understand how stress responses are under control of ascorbate recycling as a precise control of AO activity or MDHAR activity in leaves may improve yield in crop species under stress conditions (as for carbon limitation).

Acknowledgements:

We thank the greenhouse staff at INRA Avignon for the technical assistance. The PhD of Vincent Truffault was financed by INRA and the Provence-Alpes-Côte d'Azur region.

Supplemental Data

Supplemental data 1: (a) Representative pictures of Moneymaker mature plant grown under optimal growth conditions or (b) under carbon limitation (2/3 leaf removal).



Supplemental data 2: Vegetative growth parameters (number of leaves per plants; plant height) of mature plants of MNK MDHAR silenced lines (mds1MK to mds30MK) and wild type (MK1 and MK2) under normal growth conditions. One star indicates significant difference with the wild type ($p < 0.05$)

	Number of leaves	p	Plant height (cm)	p
MK1	29.9		156.6	
MK2	29.5		161.7	
mds1MK	29.4	ns	175.2	*
mds2MK	27.8	ns	157.9	ns
mds3MK	29.0	ns	166.0	ns
mds6MK	28.7	ns	171.6	ns
mds25MK	28.3	ns	155.3	ns
mds26MK	28.0	ns	160.4	ns
mds29MK	31.2	ns	162.7	ns
mds30MK	29.8	ns	169.3	ns

Supplemental data 3: Soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) concentration measured in tomato fruits of Moneymaker wild type (MK1 and MK2) and MDHAR silenced lines (mds2MK to mds26MK) at different ripening stages: (a) 20 days after anthesis and (b) orange fruits. Measurements of soluble sugars were carried out by HPLC. Results expressed in mg of ascorbate per 100g of dry weight. Six fruits were used as replicates. One point indicates significant differences ($p < 0.1$) compared to references (MK1 and MK2).

a	ripening stage	genotype	mg/100g Dw					
			glucose	<i>p</i>	fructose	<i>p</i>	sucrose	<i>p</i>
20DAA		MK1	12.2		9.4		1.9	
		MK2	12.3	ns	8.9	ns	1.8	ns
		mds2MK	12.4	ns	10.0	ns	1.8	ns
		mds6MK	12.1	ns	9.6	ns	1.7	ns
		mds25MK	13.4	.	10.1	ns	1.7	ns
		mds26MK	12.7	ns	10.0	ns	1.8	ns

b	ripening stage	genotype	mg/100g Dw					
			glucose	<i>p</i>	fructose	<i>p</i>	sucrose	<i>p</i>
orange fruit		MK1	12.1		16.5		0.8	
		MK2	12.6		16.6		0.9	
		mds2MK	14.6	.	18.9	.	0.7	.
		mds6MK	11.6	ns	15.2	ns	0.7	.
		mds25MK	11.2	ns	15.4	ns	1.0	ns
		mds26MK	11.7	ns	15.1	ns	0.9	ns

Supplemental data 4: Average yield reduction after carbon limitation, expressed as ratio of yield under optimal growth condition / yield under carbon limitation for (a) Moneymaker MDHAR modified lines experiment and (b) Moneymaker AO modified lines experiment.

a	MK1	MK2	mds1MK	mds2MK	mds3MK	mds6MK	mds25MK	mds26MK	mds29MK	mds30MK
Yield control / Yield carbon limitation	1.40	1.30	1.83	1.71	1.71	1.67	1.52	2.00	2.28	1.43

b	MK1	MK2	ao21MK	ao22MK	ao24MK	ao2MK	ao3MK	ao4MK
Yield control / Yield carbon limitation	1.07	1.30	1.43	1.08	0.83	1.18	1.39	1.07

Supplemental data 5: (a) Representative pictures of a heart-shaped fruit of Micro-Tom overexpressing lines and (b) of round-type fruit of wild type.

a



b



References

- Airaj H. El, Gest N., Truffault V., Garchery C., Riqueau G., Gouble B., Page D., Stevens R.** (2013) Decreased monodehydroascorbate reductase activity reduces tolerance to cold storage in tomato and affects fruit antioxidant levels. *Postharvest Biology and Technology* **86**:502–510.
- Attolico A.D., De Tullio M.C.** (2006) Increased ascorbate content delays flowering in long-day grown *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant physiology and biochemistry* **44**:462–466.
- Barth C., Tullio M.D., Conklin P.L.** (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**:1657–1665.
- Bartoli C.G., Casalongué C.A., Simontacchi M., Marquez-Garcia B., Foyer C.H.** (2013) Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany* **94**:73–88.
- Bartoli C.G., Yu J., Gómez F., Fernández L., McIntosh L., Foyer C.H.** (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**:1621–1631.
- Carvalho R.F., Campos M.L., Pino L.E., Crestana S.L., Zsögön A., Lima J.E., Benedito V.A., Peres L.E.** (2011) Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* **7**:1–14.
- Chai L., Wang J.M., Fan Z.-Y., Liu Z.-B., Wen G.-Q., Li X.-F., Yang Y.** (2014) Regulation of the flowering time of *Arabidopsis thaliana* by thylakoid ascorbate peroxidase. *African Journal of Biotechnology* **11**:7151–7157.
- Chen Z., Young T.E., Ling J., Chang S.-C., Gallie D.R.** (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:3525–3530.
- Cong B., Liu J., Tanksley S.D.** (2002) Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:13606–13611.
- Considine M.J., Foyer C.H.** (2013) Redox Regulation of Plant Development. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**:1305–1326.
- Eltelib H.A., Badejo A.A., Fujikawa Y., Esaka M.** (2011) Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology* **168**:619–627.
- Frary A., Nesbitt T.C., Frary A., Grandillo S., van der Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B., Tanksley S.D.** (2000) fw2.2: A Quantitative Trait Locus Key to the Evolution of Tomato Fruit Size. *Science* **289**:85–88.
- Gallie D.R.** (2013) The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany* **64**:433–443.
- Garchery C., Gest N., Do P.T., Alhagdow M., Baldet P., Menard G., Rothan C., Massot C., Gautier H., Aarouf J., Fernie A.R., Stevens R.** (2013) A diminution in ascorbate

oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. *Plant, Cell & Environment* **36**:159–175.

Gest N., Garchery C., Gautier H., Jiménez A., Stevens R. (2013a) Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnology Journal* **11**:344–354.

Gest N., Gautier H., Stevens R. (2013b) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany* **64**:33–53.

Gomez L., Rubio E., Augé M. (2002) A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**:360–369.

Gonzalez-Reyes J., Alcaín F., Caler J., Serrano A., Cordoba F., Navas P. (1995) Stimulation of Onion Root Elongation by Ascorbate and Ascorbate Free-Radical in *Allium-Cepa* L. *Protoplasma* **184**:31–35.

Guillet C., Aboul-Soud M.A.M., Le Menn A., Viron N., Pribat A., Germain V., Just D., Baldet P., Rousselle P., Lemaire-Chamley M., Rothan C. (2012) Regulation of the Fruit-Specific PEP Carboxylase SIPP2 Promoter at Early Stages of Tomato Fruit Development. *PLoS ONE* **7**:e36795.

Haroldsen V.M., Chi-Ham C.L., Kulkarni S., Lorence A., Bennett A.B. (2011) Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**:1244–1249.

Ioannidi E., Kalamaki M.S., Engineer C., Pateraki I., Alexandrou D., Mellidou I., Giovannonni J., Kanellis A.K. (2009) Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **60**:663–678.

De Jong M., Mariani C., Vriezen W.H. (2009a) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany* **60**:1523–1532.

De Jong M., Wolters-Arts M., Feron R., Mariani C., Vriezen W.H. (2009b) The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *The Plant Journal* **57**:160–170.

Just D., Garcia V., Fernandez L., Bres C., Mauxion J.-P., Petit J., Jorly J., Assali J., Bournonville C., Ferrand C., Baldet P., Lemaire-Chamley M., Mori K., Okabe Y., Ariizumi T., Asamizu E., Ezura H., Rothan C. (2013) Micro-Tom mutants for functional analysis of target genes and discovery of new alleles in tomato. *Plant Biotechnology Journal* **30**:225–231.

Kato N., Esaka M. (2000) Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. *Planta* **210**:1018–1022.

Kerk N.M., Jiang K., Feldman L.J. (2000) Auxin Metabolism in the Root Apical Meristem. *Plant Physiology* **122**:925–932.

Kim Y.-S., Kim I.-S., Bae M.-J., Choe Y.-H., Kim Y.-H., Park H.-M., Kang H.-G., Yoon H.-S. (2013) Homologous expression of cytosolic dehydroascorbate reductase increases grain yield and biomass under paddy field conditions in transgenic rice (*Oryza sativa* L. japonica). *Planta* **237**:1613–1625.

- Kocsy G., Tari I., Vanková R., Zechmann B., Gulyás Z., Poór P., Galiba G.** (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Science* **211**:77–91.
- Kotchoni S.O., Larrimore K.E., Mukherjee M., Kempinski C.F., Barth C.** (2009) Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**:803–815.
- Lisko K.A., Torres R., Harris R.S., Belisle M., Vaughan M.M., Jullian B., Chevone B.I., Mendes P., Nessler C.L., Lorence A.** (2013) Elevating vitamin C content via overexpression of myo-inositol oxygenase and l-gulonolactone oxidase in *Arabidopsis* leads to enhanced biomass and tolerance to abiotic stresses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **49**:643–655.
- Liso R., Calabrese G., Bitonti M.B., Arrigoni O.** (1984) Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental Cell Research* **150**:314–320.
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G.** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**:465–474.
- Nesbitt T.C., Tanksley S.D.** (2002) Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*. Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics* **162**:365–379.
- Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H.** (2003) Leaf Vitamin C Contents Modulate Plant Defense Transcripts and Regulate Genes That Control Development through Hormone Signaling. *The Plant Cell Online* **15**:939–951.
- Pignocchi C., Fletcher J.M., Wilkinson J.E., Barnes J.D., Foyer C.H.** (2003) The Function of Ascorbate Oxidase in Tobacco. *Plant Physiology* **132**:1631–1641.
- Pinto M.C. de, Francis D., Gara L.D.** (1999) The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **209**:90–97.
- Potters G., Horemans N., Bellone S., Caubergs R.J., Trost P., Guisez Y., Asard H.** (2004) Dehydroascorbate Influences the Plant Cell Cycle through a Glutathione-Independent Reduction Mechanism. *Plant Physiology* **134**:1479–1487.
- Qin A., Shi Q., Yu X.** (2011) Ascorbic acid contents in transgenic potato plants overexpressing two dehydroascorbate reductase genes. *Molecular Biology Reports* **38**:1557–1566.
- Ranc N., Muñoz S., Santoni S., Causse M.** (2008) A clarified position for *solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology* **8**:130.
- Ren J., Duan W., Chen Z., Zhang S., Song X., Liu T., Hou X., Li Y.** (2014) Overexpression of the Monodehydroascorbate Reductase Gene from Non-heading Chinese Cabbage Reduces Ascorbate Level and Growth in Transgenic Tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter*:1–12.

- Sagar M., Chervin C., Mila I., Hao Y., Roustan J.-P., Benichou M., Gibon Y., Biais B., Maury P., Latché A., Pech J.-C., Bouzayen M., Zouine M.** (2013) SIARF4, an Auxin Response Factor Involved in the Control of Sugar Metabolism during Tomato Fruit Development. *Plant Physiology* **161**:1362–1374.
- Serrani J.C., Fos M., Atarés A., García-Martínez J.L.** (2007) Effect of Gibberellin and Auxin on Parthenocarpic Fruit Growth Induction in the cv Micro-Tom of Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**:211–221.
- Stevens R., Buret M., Duffé P., Garchery C., Baldet P., Rothan C., Causse M.** (2007) Candidate Genes and Quantitative Trait Loci Affecting Fruit Ascorbic Acid Content in Three Tomato Populations. *Plant Physiology* **143**:1943–1953.
- Stevens R., Buret M., Garchery C., Carretero Y., Causse M.** (2006) Technique for Rapid, Small-Scale Analysis of Vitamin C Levels in Fruit and Application to a Tomato Mutant Collection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:6159–6165.
- Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zamir D., Causse M.** (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, cell & environment* **31**:1086–1096.
- Su L., Bassa C., Audran C., Mila I., Cheniclet C., Chevalier C., Bouzayen M., Roustan J.-P., Chervin C.** (2014) The Auxin SI-IAA17 Transcriptional Repressor Controls Fruit Size Via the Regulation of Endoreduplication-Related Cell Expansion. *Plant and Cell Physiology* **55**:1969–1976.
- Tanksley S.D.** (2004) The Genetic, Developmental, and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. *The Plant Cell* **16**:S181–S189.
- Truffault V., Gest N., Garchery C., Florian A. Fernie A.R., Gautier H., Stevens R.** (Submitted) Reduction of MDHAR activity in cherry tomato suppresses growth and yield and MDHAR activity is correlated with sugar levels under high light. *Plant, Cell and Environment*.
- Tsaniklidis G., Delis C., Nikoloudakis N., Katinakis P., Aivalakis G.** (2014) Low temperature storage affects the ascorbic acid metabolism of cherry tomato fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* **84**:149–157.
- Wang Z., Xiao Y., Chen W., Tang K., Zhang L.** (2010) Increased Vitamin C Content Accompanied by an Enhanced Recycling Pathway Confers Oxidative Stress Tolerance in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**:400–409.
- Woodward A.W., Bartel B.** (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* **95**:707–735.
- Ye Z., Rodriguez R., Tran A., Hoang H., de los Santos D., Brown S., Vellanoweth R.L.** (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in Arabidopsis thaliana. *Plant Science* **158**:115–127.

Annexe aux chapitres 1 et 2

Mise au point de la détection et du dosage du radical MDHA

Nos études réalisées sur du matériel végétal dont l'activité de l'enzyme MDHAR de recyclage de l'ascorbate a été modifiée (voir les chapitres précédents) ont révélées d'intéressants liens entre le recyclage de la forme radicalaire de l'ascorbate et le rendement (à travers des modifications de l'expansion des cellules du fruit ou par un nombre de fruits réduits sur la plante). Une corrélation négative entre la teneur en ascorbate et l'activité de l'enzyme a également été notée sur une variété de tomate cerise (WVA 106), mais ceci n'a pas été confirmé sur un cultivar de tomate à gros fruits (Moneymaker). Par ailleurs, des données sur des lignées dont l'activité ascorbate oxydase a été réduite nous indiquent que le couple d'enzymes MDHAR et AO joue un rôle essentiel dans l'expansion cellulaire, et ainsi sur l'établissement du rendement notamment en situation de stress. Les activités de MDHAR et d'AO ont bien été affectées et les dosages d'expression de des gènes codant pour ces enzymes ont confirmées leurs modifications. Cependant, l'impact de ces changements d'activité n'a jamais été étudié sur le radical MDHA, qui joue à la fois le rôle de substrat pour la MDHAR et celui de produit pour l'AO. Les hypothèses pouvant expliquer les phénotypes observés comprennent le ratio entre les activités de ces deux enzymes mais également la teneur en MDHA. En effet, de nombreuses études mentionnent le rôle du MDHA sur l'expansion cellulaire (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Horemans et al., 1994; Schopfer et al., 2002; Smirnoff and Wheeler, 2000). Le MDHA est le résultat de l'activité enzymatique de l'ascorbate oxydase mais peut également provenir d'une réaction non-enzymatique de l'ascorbate réduit avec des espèces réactives de l'oxygène. Le dosage direct de MDHA n'a jamais été réalisé sur nos lignées.

Le radical MDHA est une espèce paramagnétique possédant un électron non apparié. La détection des espèces paramagnétiques peut être effectuée par la spectrométrie de Résonance Paramagnétique Electronique, ou RPE. Le radical MDHA possède un temps de demi-vie relativement long pour une espèce radicalaire, et peut ainsi être facilement détecté par RPE (Buettner et Jurkiewicz, 1993). La RPE repose sur l'absorption de radiations par les électrons non appariés lorsque l'on expose la molécule à un champ magnétique. Le champ magnétique va dépolariser l'électron non apparié et provoquer un basculement de sa rotation de 180°. L'électron va alors retourner à l'état initial et produire de l'énergie qui sera captée par la RPE et traduit en un spectre caractéristique du MDHA. Nous avons donc réalisé des mesures sur du matériel Micro-Tom dont l'activité MDHAR a été surexprimée (MDHAR +) ou sous-exprimée (MDHAR -).

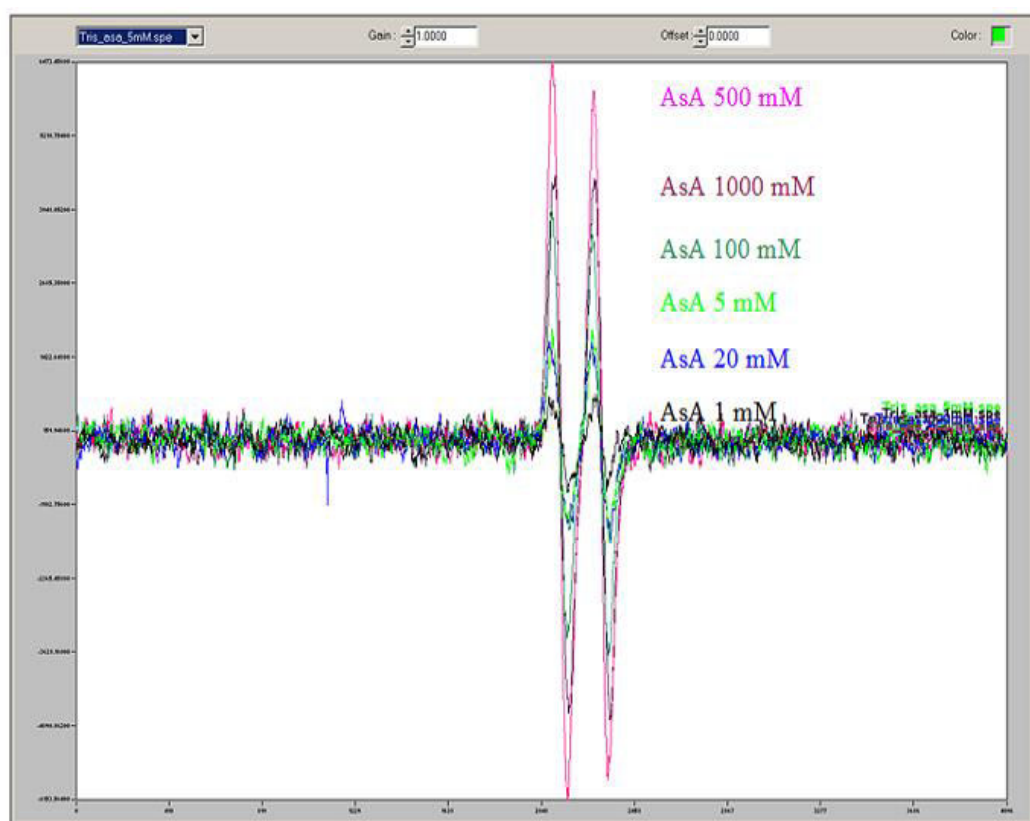


Figure 1 : Relation entre la teneur en ascorbate d'une solution et l'intensité du signal RPE du radical MDHA.

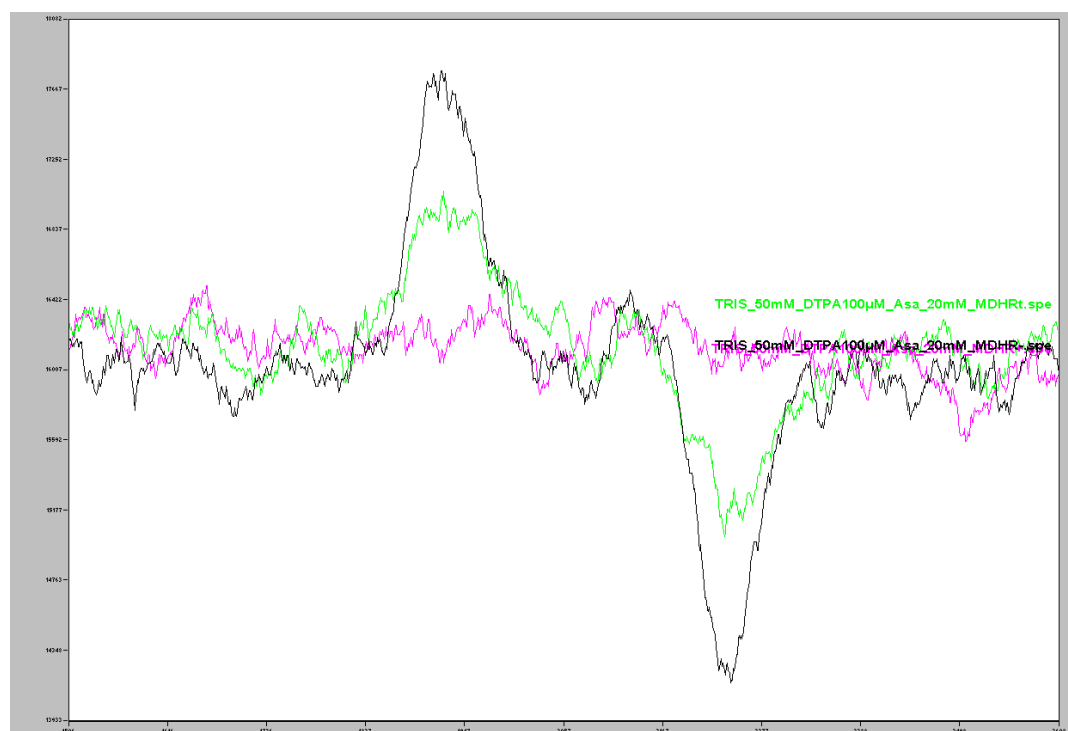


Figure 2 : Intensité du signal RPE du radical MDHA en présence d'une solution d'ascorbate à 20mM. Le témoin est représenté en vert, les lignées MDHAR – en noir, et enfin les plantes MDHAR + en rose.

L'acquisition des spectres RPE a été réalisée sur un appareil Miniscope MS300 Magnettech équipé d'une lampe UV. Les paramètres d'acquisition utilisés sont : puissance, 10 mW; amplitude modulation, 2G ; gains, 900; temps d'acquisition, 12 secondes et la fenêtre de champ, 3349.06G. Les résultats suivants ont été obtenus en collaboration avec le laboratoire Chimie Bio-organique et Systèmes Amphiphiles de l'Université d'Avignon, dirigé par Grégory Durand.

Résultats

Dans un premier temps, la détection du signal RPE du radical MDHA a été réalisée à l'aide de solutions d'ascorbate présentant des concentrations différentes en ascorbate. Nous avons donc observé une corrélation presque parfaite entre la teneur en ascorbate de la solution et l'intensité du signal MDHA (**Figure 1**). En effet, une concentration de 500mM d'ascorbate a entraîné l'apparition d'un signal RPE plus fort qu'avec une concentration de 1M, seul bémol à la corrélation parfaite décrite ci-avant. Nous avons ensuite tenté de doser le radical MDHA dans nos lignées MDHAR – et MDHAR + (en comparaison avec un témoin). Malheureusement, la détection directe du MDHA n'a pas pu être possible (due à une intensité trop faible du signal), et, en plus de l'échantillon végétal (50 mg poudre fraîche dans un volume de 100µl de tampon Tris 100mM), nous avons ajouté une solution d'ascorbate (0mM ; 10mM ; 20mM et 50mM). Des nouvelles analyses seront nécessaires dans l'objectif d'améliorer le protocole de détection dans du matériel végétal. En quelque sorte, nous avons donc confirmé l'activité MDHAR de nos lignées (**Figure 2**). Les plantes MDHAR – présentent une accumulation de ce radical plus forte dans des feuilles en comparaison avec le témoin. Ce résultat confirme la réduction de l'activité de l'enzyme MDHAR dans ces plantes. Les plantes MDHAR + présentent une concentration en MDHA très faible (voir indétectable), confirmant une activité accrue de recyclage par l'enzyme. Ce qui est par contre très intéressant et novateur, c'est l'apparition d'une corrélation entre la teneur en ascorbate du milieu et l'activité MDHAR. En effet, lorsque l'on augmente la concentration en ascorbate au-delà de 50mM dans le broyat de feuilles, les observations détaillées ci-avant sont infirmées. Les plantes MDHAR + voient alors la teneur en MDHA atteindre une valeur très forte lorsque la concentration en ascorbate du milieu est de 50mM (**Figure 3**) et 100mM (**Figure 4**). Ces dosages ont été confirmés par plusieurs répétitions techniques. L'hypothèse la plus probable pourrait être que lorsque la teneur en ascorbate est forte dans les cellules, un rétrocontrôle de l'ascorbate sur l'activité de l'enzyme MDHAR ou celle d'AO est envisageable. Un tel rétrocontrôle existe en effet sur la teneur en ascorbate à travers la molécule elle-même d'ascorbate et les gènes de la voie de biosynthèse en cas de fortes concentrations en ascorbate (Mieda et al., 2004; Wolucka and Montagu, 2003). Cependant, de nouvelles analyses devront être réalisées dans le but de confirmer ces observations.

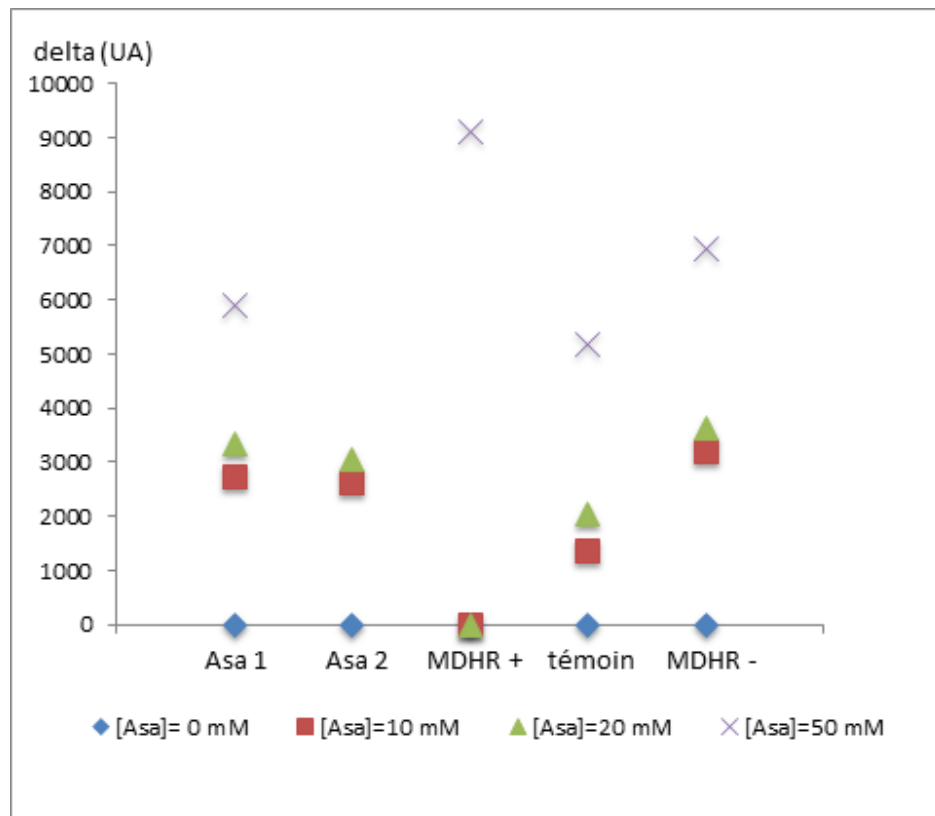


Figure 3 : Concentration du radical MDHA dans des feuilles de Micro-Tom témoin, MDHAR + et MDHAR - en présence d'une concentration en ascorbate de 0mM (losange), 10mM (carré), 20mM (triangle) et 50mM (croix). Un point est manquant pour la répétition avec Asa 2 à 50mM.

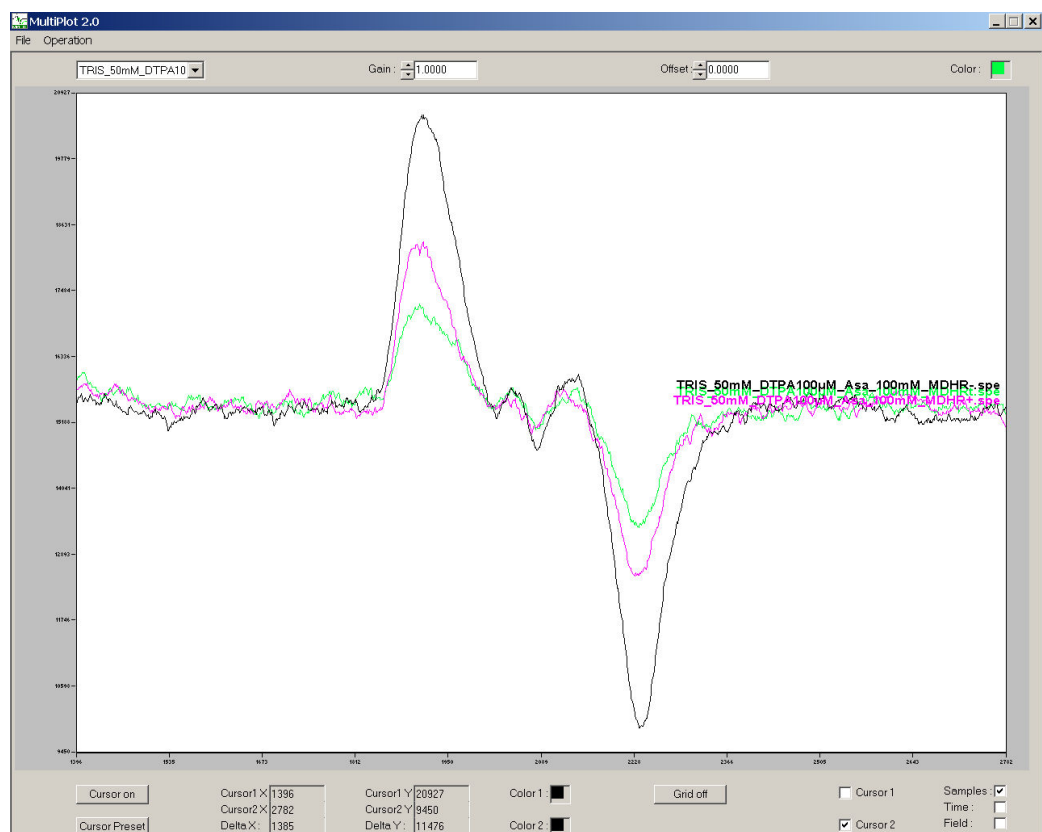


Figure 4 : Intensité du signal RPE du radical MDHA en présence d'une solution d'ascorbate à 100mM. Le témoin est représenté en vert, les lignées MDHAR - en noir, et enfin les plantes MDHAR + en rose.

Ces résultats ont été obtenus grâce au soutien et à l'expertise de Kamal Zeamari et de Grégory Durand, de l'unité Chimie bioorganique et systèmes aphyphiles de l'Université d'Avignon.

Références

Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. (1993) Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: An EPR study. *Free Radical Biology and Medicine* **14**:49–55.

Gonzalez-Reyes J., Alcaín F., Caler J., Serrano A., Cordoba F., Navas P. (1995) Stimulation of Onion Root Elongation by Ascorbate and Ascorbate Free-Radical in *Allium-Cepa* L. *Protoplasma* **184**:31–35.

Horemans N., Asard H., Caubergs R.J. (1994) The Role of Ascorbate Free Radical as an Electron Acceptor to Cytochrome b-Mediated Trans-Plasma Membrane Electron Transport in Higher Plants. *Plant Physiology* **104**:1455–1458.

Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. (2004) Feedback Inhibition of Spinach L-Galactose Dehydrogenase by L-Ascorbate. *Plant and Cell Physiology* **45**:1271–1279.

Schopfer P., Liskay A., Bechtold M., Frahy G., Wagner A. (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**:821–828.

Smirnoff N., Wheeler G.L. (2000) Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**:291–314.

Wolucka B.A., Montagu M.V. (2003) GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**:47483–47490.

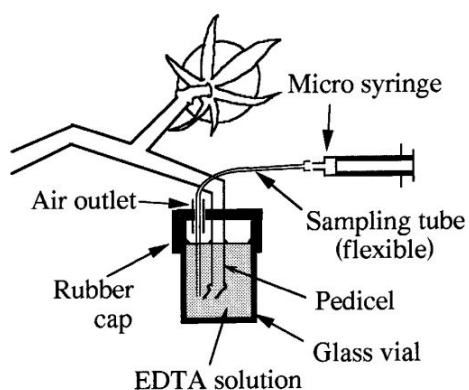


Figure 1 : Schéma de mise en place d'un essai permettant la collecte d'exsudat de phloème chez la tomate.

Table 1 : Concentrations en saccharose, glucose et fructose dans le liquide apoplastique de fruits des lignées suivantes : témoin (WT), sous-exprimant la MDHAR (mds3 et mds5) et sur-exprimant la MDHAR (sx1.7 et sx6.10). Les valeurs sont exprimées en g/l après une analyse par HPLC. Une étoile indique une différence significative avec le témoin ($p < 0.05$), un point $p < 0.1$.

gneotype	<i>expressed in g/l</i>					
	Sucrose	<i>p</i>	Glucose	<i>p</i>	Fructose	<i>p</i>
WT	0.37		3.75		3.94	
mds3	0.22	*	3.39	ns	3.85	ns
mds5	0.27	•	3.40	ns	3.64	ns
sx1.7	0.37	ns	3.96	ns	3.87	ns
sx6.10	0.32	ns	4.24	ns	4.24	ns

Transport des assimilats vers les fruits

Le phénotype « petit fruit » observé dans les lignes de tomate cerise sous-exprimant la MDHAR s'est révélé fortement corrélé avec le métabolisme des sucres. La photosynthèse, source de carbone pour la croissance, n'est pas responsable du phénotype observé alors qu'une modification ou non de celle-ci aboutit au même phénotype. La source (les organes photosynthétiques) fournit assez d'assimilats mais ceux-ci ne sont pas présents en quantité suffisante pour assurer une croissance optimale des cellules du fruit. En effet, la force du puit semble reliée à l'établissement de ce phénotype puisqu'une réduction du nombre de fruit par bouquet restaure en partie le phénotype du témoin. Une autre hypothèse mettrait en jeu l'utilisation de ces ressources carbonées, notamment après le déchargement depuis le phloème. Les enzymes qui catalysent la réaction aboutissant à la libération d'hexoses à partir du saccharose ont été étudiées mais les activités de ces enzymes ne révèlent pas de différence significative pouvant expliquer le phénotype « petit fruit ». Une autre hypothèse brièvement étudiée au cours de cette thèse se penchait sur le transport des assimilats vers le fruit. Le chargement ou le déchargement des assimilats dans le phloème pourraient être perturbés et aboutir à un transport de carbone réduit pour la croissance du fruit. Nous avons notamment observé que la teneur en saccharose était réduite dans les jeunes fruits en croissance, supportant l'hypothèse d'un transport affecté.

Protocoles et résultats

Nous avons dans un premier temps mis en place un essai dans le but d'étudier la composition du phloème. La collecte d'exsudats de phloème a été envisagée mais la mise en place n'a pas été concluante. Des fruits des lignées MDHAR – et des fruits témoins ont été détachés du pédicelle, puis ce dernier a été traité avec une solution de 20mM EDTA (ajusté à pH7.0 par du KOH). Le pédicelle a été immergé dans une solution d'EDTA et les exsudats collectés après quelques heures (**Figure 1**). Nous n'avons pas réussi à collecter assez d'exsudats pour permettre l'analyse. Nous nous sommes alors penchés sur la composition de l'apoplaste. Le transport des assimilats peut en effet être assuré par la voie apoplasmique ou par la voie symplasmique. Des prélèvements de liquide apoplastique sont ainsi réalisés lors d'une culture d'automne en serre sur des fruits de WVA 106 (lignées MDHAR -, MDHAR + et témoin), et un dosage de sucres par HPLC est effectué (**Table 1**). On note que la concentration en saccharose est diminuée en comparaison avec le témoin dans le liquide apoplastique des lignées mds3 ($p < 0.05$) et mds5 ($p < 0.1$), deux lignées présentant une réduction de la taille de leurs fruits. A l'inverse, les teneurs en hexose ne sont pas différentes. Enfin, les lignées sur-exprimant l'enzyme présentent un profil similaire à celui du témoin. Des analyses supplémentaires devront être réalisées afin de valider statistiquement les observations mentionnées ci-dessus.



Figure 2 : Photographie du dispositif « fruits détachés ». Des fruits sont détachés de leur bouquet et placés sur un support dans le même microclimat que les fruits restés sur le bouquet (bague bleue).

Enfin, afin de discriminer les apports de sucres arrivant aux fruits et l'effet du métabolisme interne de l'organe, nous avons détaché des fruits de la plante, puis placés pendant 24h, 48h ou 72h sur un support placé à proximité du bouquet avec une petite bille de Terostat (joint d'étanchéité) sur la cicatrice du pédoncule du fruit afin d'éviter les pertes d'eau. Ce dispositif permet d'homogénéiser les conditions microclimatiques des fruits détachés avec ceux restés sur le bouquet (**Figure 2**). Les fruits détachés et attachés sont ensuite broyés dans l'azote liquide avant une analyse HPLC de teneurs en sucres sur l'ensemble des péricarpes des fruits étudiés. Deux stades de maturation des fruits ont été choisis : fruit jeune en croissance (âgé 20 jours après anthèse) et fruit rouge. L'accumulation des hexoses est fortement activée en fin de maturation, tandis que les apports en saccharose sont assurés en début de croissance du fruit. Malheureusement, les échantillons des fruits jeunes en croissance ont été perdus. Seuls restaient les échantillons des fruits rouges. Les résultats sur ces derniers n'ont pas été concluants. En effet, même après 72h de traitement en fruits détachés, aucune différence significative n'est observée avec les fruits restants sur le bouquet (**Figure 3**). Au stade rouge mature, les transports de sucres sont terminés depuis la plante, le fruit est autonome. Nous confirmons cependant la concentration plus faible en saccharose et en hexoses de la lignée indépendante *mds5* (présentant le phénotype « petit fruit » le plus marqué). L'expérimentation pourra être répétée en s'intéressant uniquement aux jeunes fruits en croissance afin d'enregistrer les apports en sucres provenant de la plante.

Malgré les difficultés techniques rencontrées durant les essais détaillés ci-dessus, un focus plus important sur les transports des assimilats vers les organes puits pourra amener de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes responsables de l'élaboration du phénotype « petit fruit ». Une répétition de la manipulation fruits détachés avec des fruits jeunes en croissance est envisagée.

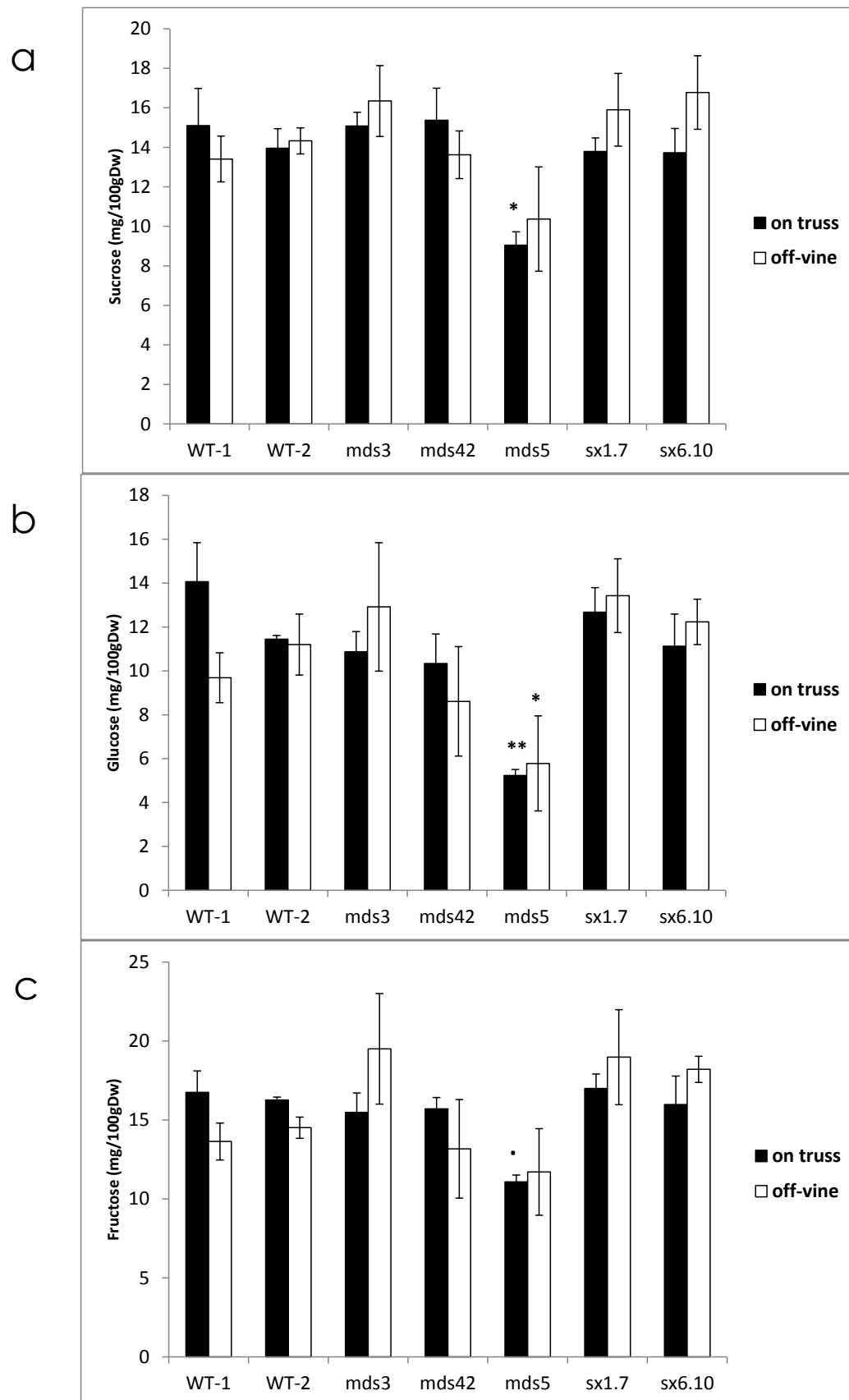
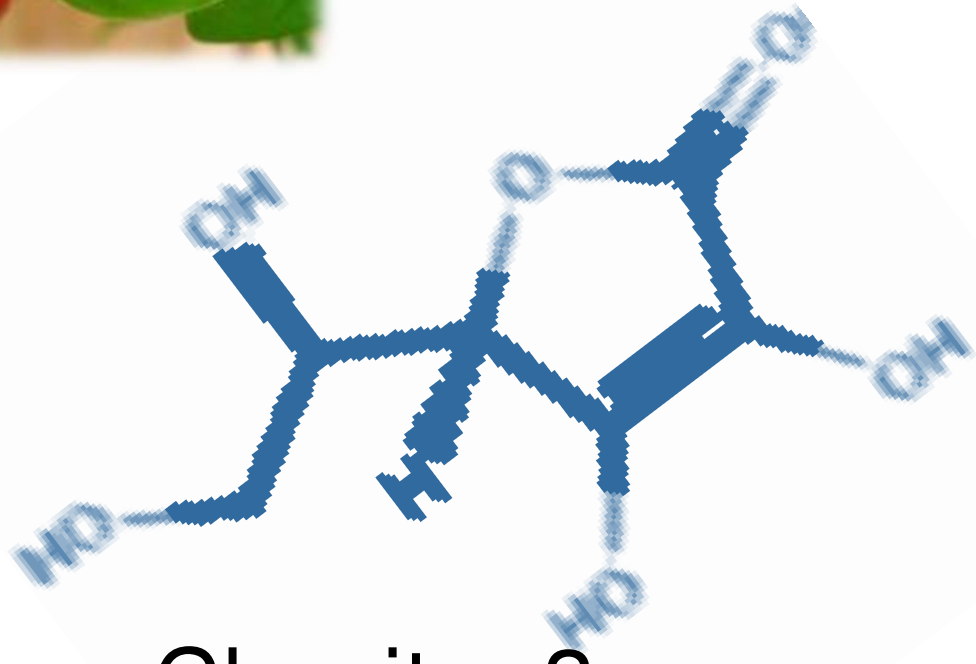
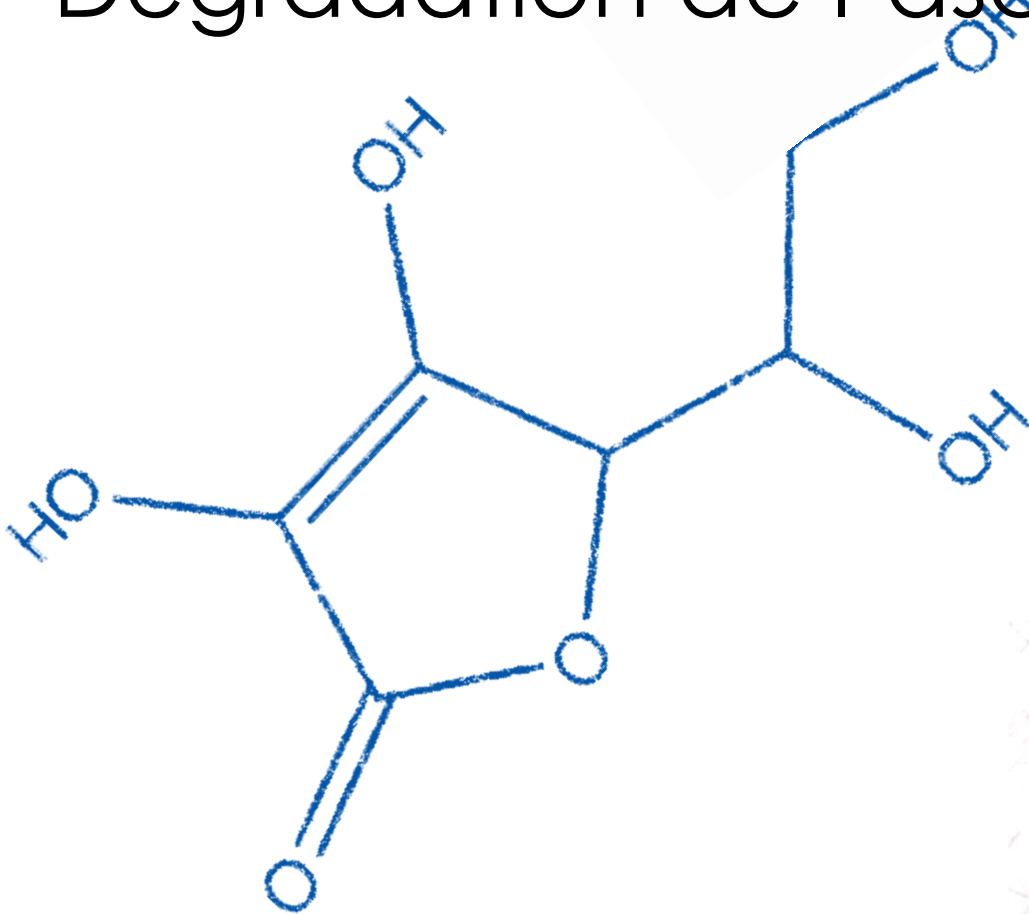


Figure 3 : Concentrations en (a) saccharose, (b) glucose et (c) fructose dans des fruits rouges détachés de leur bouquet pendant 72h (off-vine) ou attachés (on truss). Valeurs exprimées en mg/100g de matière sèche après analyse par HPLC. Deux étoiles indiquent une différence significative avec le témoin ($p < 0.01$), une étoile ($p < 0.05$), un point ($p < 0.1$).



Chapitre 3

Dégradation de l'ascorbate



Avant-propos

Nous avons observé dans les chapitres précédents l'importance du métabolisme de l'ascorbate dans la croissance et le rendement chez la tomate. Le métabolisme de l'ascorbate comprend sa biosynthèse, son recyclage, sa dégradation et son transport entre les cellules de la plante. Le mécanisme de dégradation de l'ascorbate reste assez obscur et peu étudié, particulièrement chez la tomate. La dégradation entraîne une perte irréversible du pool d'ascorbate pour aboutir à la génération de nouveaux composés, dont la nature et les rôles restent inconnus chez la tomate. La compréhension du fonctionnement du catabolisme de l'ascorbate, en relation avec les paramètres environnementaux (alors que nous avons précédemment relevé les liens profonds entre la biosynthèse et le recyclage de l'ascorbate avec les conditions lumineuses notamment) représente donc une étape indispensable pour décrire l'évolution du pool d'ascorbate au cours du temps. La connaissance complète du métabolisme de l'ascorbate permettrait par exemple de proposer des voies d'amélioration de la teneur en vitamine C dans le fruit dans le but d'optimiser sa valeur nutritionnelle, en contrôlant sa dégradation. Les potentielles régulations par l'environnement et par la génétique de la dégradation sont proposées dans ce chapitre. Par ailleurs, alors que la croissance des cellules et le métabolisme de l'ascorbate ont articulés les chapitres précédents, nous nous intéresserons également dans ce chapitre aux liens existants entre dégradation de l'ascorbate et expansion cellulaire. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'université d'Edimbourg en Ecosse qui avait précédemment publié la voie de dégradation de l'ascorbate dans l'apoplaste de cellules de Rosier (Green et Fry, 2005b).

Ce chapitre est présenté sous forme d'article. Il sera soumis pour publication prochainement.

ASCORBATE DEGRADATION RATE IN TOMATO SHOWS INDEPENDANCY WITH ASCORBATE CONTENT AND IS STIMULATED IN DARKNESS LEADING TO ACCUMULATION OF OXALATE, THREONATE AND THE INTERMEDIATE OXALYL-THREONATE

Abstract

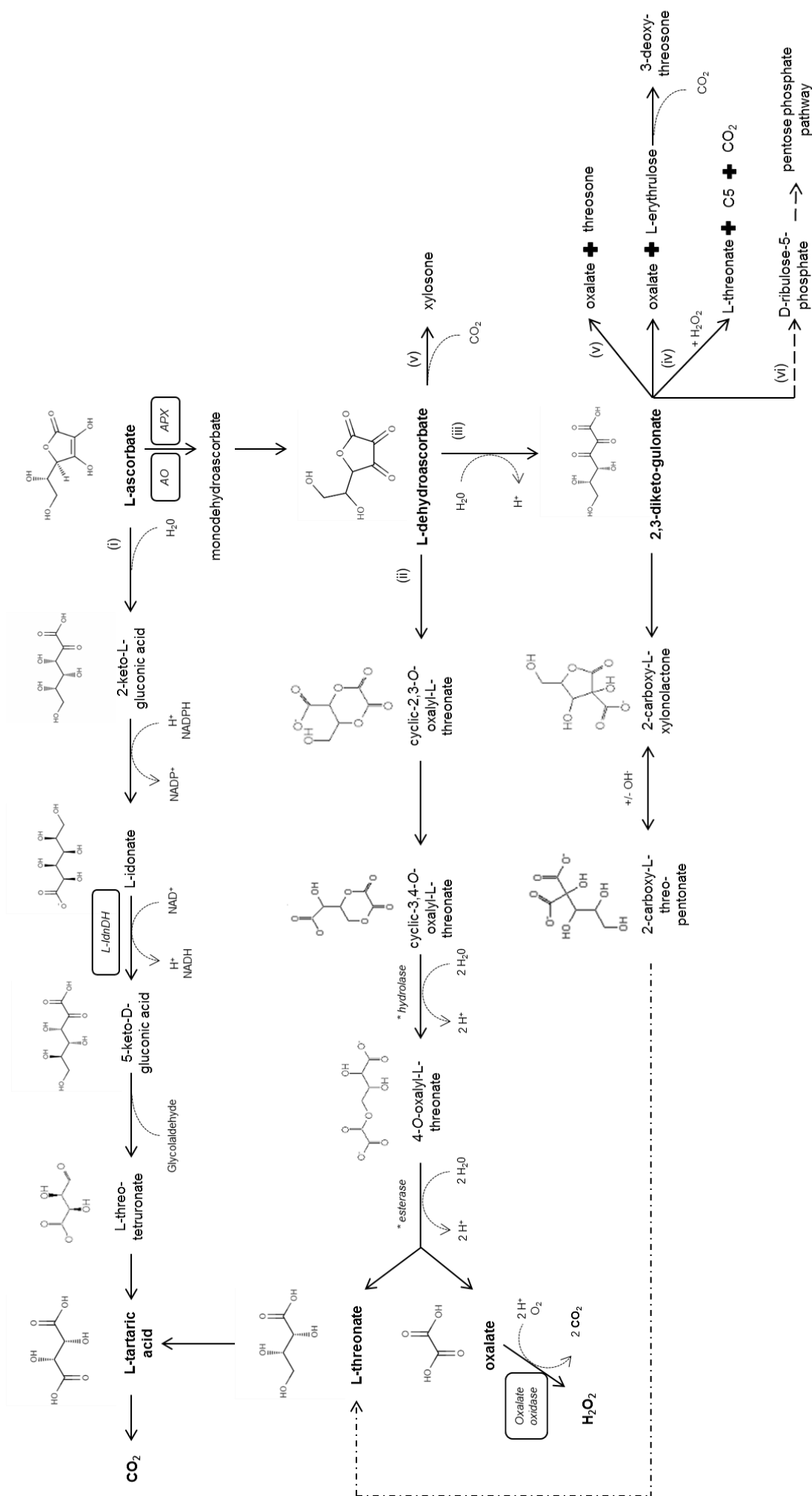
Ascorbate content in plants is controlled by its synthesis from glucose, recycling of the oxidized forms and degradation. Of these pathways, ascorbate degradation is the least studied and represents a lack of knowledge which could impair improvement of ascorbate content in fruits and vegetables as degradation is non-reversible and leads to a depletion of the ascorbate pool. The present study revealed the nature of degradation products using [^{14}C] ascorbate labeling in tomato. Oxalate and threonate are accumulated in leaves as is the intermediate oxalyl-threonate. Carboxypentonates coming from diketogulonate degradation were detected in insoluble leaf fractions. No tartaric acid was found in tomato. Ascorbate degradation was stimulated by darkness, and the degradation rate was evaluated at 38% of the ascorbate pool in 24h, a percentage that was constant and independent of the initial ascorbate or dehydroascorbate concentration. Furthermore, degradation could be partially regulated by the recycling pathway of ascorbate, as lines under-expressing monodehydroascorbate reductase showed a decrease in degradation products accumulation.

Keywords: ascorbate degradation, ascorbate recycling, tomato, light environment, oxalate, threonate.

Ascorbate is a small inorganic acid derived from sugars. In plants, ascorbate is a key molecule involved in numerous cellular processes (cell division and expansion, photo-protection, enzyme cofactor, cell signaling) (Smirnoff and Wheeler, 2000). Ascorbate is an essential antioxidant for plants, protecting the cell from reactive oxygen species (ROS). The cellular concentration of ascorbate depends on its transport, biosynthesis, recycling and degradation: these are under genetic control and closely related to environmental conditions. According to multiple studies, one of the key genes of the biosynthetic pathway is *vtc2* (coding for GDP-L-galactose phosphorylase) which is up-regulated by light in leaves (Laing et al., 2015). Recycling of oxidized ascorbate (MDHA or DHA) to the reduced form (AsA) occurs via two enzymes monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR). MDHAR is an NADH-dependent enzyme which can reduce MDHA into AsA. DHAR uses glutathione as electron donor to reduce DHA into AsA. If not reduced by MDHAR or DHAR, ascorbate is degraded.

Ascorbate degradation in mammals as in plants has been poorly studied. In **Figure 1**, we sum up current knowledge about ascorbate degradation in mammals and plants. Degradation occurs *in vitro* via the unstable oxidized form dehydroascorbate and could lead to the accumulation of end-products 2,3-diketogulonate, L-erythrulose (Nemet and Monnier, 2011), oxalate, L-threonate, L-xylosone, L-lyxonate, L-threosone and 3-deoxythreosone (Linster et Van Schaftingen, 2007; Simpson and Ortwerth, 2000). In humans, ascorbate degradation has been followed using radiolabeled experiments. After ingestion in the human body, 44% of ascorbate (labeled on carbon 1) could be recovered in urine as oxalate, 20% as diketogulonate and 2% as dehydroascorbate (Hellman and Burns, 1958). Recently, multiples studies have shown that ascorbate degradation products could interact with proteins and lead to the formation of advanced-glycation-end-products (AGE), suspected to play a role in complications in diabetes and cellular degeneration (Kay et al., 2013; Regulus et al., 2010). In *Escherichia coli*, ascorbate can be used as source of carbon under anaerobic conditions, through enzymatic degradation of diketogulonate to generate ribulose-phosphate, which can then participate in the pentose phosphate pathway (Yew and Gerlt, 2002).

In plants, the *in vivo* degradation pathway involved enzymatic reactions as well as non-enzymatic ones starting from ascorbate or dehydroascorbate (Green and Fry, 2005b). End-products of the degradation pathway are species dependent and include L-tartrate or oxalate and threonate (**Figure 1**; (DeBolt et al., 2006; Green and Fry, 2005a; Hancock and Viola, 2005; Melino et al., 2009). Tartrate is formed by cleavage of the ascorbate skeleton between carbon 4 and 5. The only enzyme identified for the moment is L-idonate deshydrogenase (DeBolt et al., 2006) which catalyzes the conversion of L-idonate (derived from reduced ascorbate) into 5-keto-gluconic acid, a precursor of L-tartrate.



This degradation pathway may occur enzymatically or non-enzymatically in species such as grapes (grape berries are also known to accumulate oxalate (DeBolt et al., 2004), and thus use two degradation pathways within the same organ) and other *Vitaceae* (Hancock and Viola, 2005). Tartrate accumulation could also be the result of a conversion of L-threonate to L-tartrate as in *Pelargonium crispum* (Wagner and Loewus, 1973). In grape berries, tartaric acid deriving from ascorbate degradation is stored as calcium or potassium salt of tartrate (DeBolt et al., 2004) during fruit development until 50 days after anthesis, but it appears that a small amount of ascorbate is actually used for the synthesis of L-tartrate (Melino et al., 2009). During late phases of ripening, calcium or potassium salt of tartrate could be released as free form of tartaric acid (Saito et Kasai, 1968). Tartaric acid is the major acid found in wine, contributing to its taste.

The formation of oxalate and threonate results from the cleavage of ascorbate between carbon 2 and 3. Intermediates between oxalate and threonate end-products and dehydroascorbate have been reported in the apoplast of *Rosa* cells (Green and Fry, 2005a): cyclic-oxalyl-L-threonate and oxalyl-L-threonate. *In-vitro* models have established that dehydroascorbate degradation could also occur via hydrolysis into diketogulonate (DKG degradation branch). Diketogulonate could be further hydrolyzed into carboxypentonates (Parsons et al., 2011). This apoplastic degradation pathway might also occur in other cellular compartments. The proposed pathway could occur non-enzymatically *in vitro* but some steps are catalyzed by unknown enzymes as some reactions occur more rapidly *in vivo* (Green and Fry, 2005a). In lemon geranium, L-threonate is accumulated (Helsper and Loewus, 1982) but could also be decarboxylated to L-glycerate (Loewus, 1999). Oxalate accumulates in spinach, woodsorrel, shamrock and begonia (Yang and Loewus, 1975). In *Rumex* leaves (Helsper and Loewus, 1982), 24h radiolabeled experiments with [U-¹⁴C]-Ascorbate revealed the following radioactive distribution: 1% in tartaric acid, 14% in threonate, 11% in oxalate, 14% in ascorbate residue, 49% in others compounds and 11% in carbon dioxide (CO₂).

There is little information about the potential role of these degradation products in plant cells. Oxalate is a very simple dicarboxylic acid which can be found in vacuoles (linked with potassium, sodium or magnesium) or as a free acid. Oxalate could be very abundant in oxalate accumulating plants, reaching 3% up to 80% of dry mass (Libert et Franceschi, 1987). Oxalate can be rapidly linked to calcium leading to the formation of calcium oxalate crystals, localized in cell walls (Khan, 1995) and specialized cells (idioblasts). Ascorbate degradation could be the first source of oxalate required for the formation of crystals with calcium in many species (Franceschi et Nakata, 2005; Loewus, 1999), with the exception of rice (Yu et al., 2010a) and probably a few others species. Calcium oxalate crystals are found in a wide diversity of plants and animals.

These crystals are in charge of the regulation of the calcium pool of the cell (90% of the calcium of the plant is found in calcium oxalate crystals) but could also act in the defense process against herbivory (Franceschi et Nakata, 2005), and in growth processes (Nakata, 2012; Nakata et McConn, 2003). Despite the lack of information on ascorbate catabolism pathways, the degradation rate is often positively correlated to cell expansion (Dumville and Fry, 2003; Müller et al., 2009).

The genetic and environmental impacts on the ascorbate synthesis and recycling pathways have been well-studied in a large diversity of plants (Bartoli et al., 2006; Dowdle et al., 2007; Gautier et al., 2008; Hamner et al., 1945; Massot et al., 2013). Light is supposed to be the most important environmental parameter altering ascorbate content. Ascorbate biosynthesis is activated by light: an increase of 66% of ascorbate content in tomato leaves was found when plants were transferred from darkness to light (Hamner et al., 1945). Environmental control of the degradation rate has been poorly studied. Conklin et al. (1997) showed that radiolabeled ascorbate infiltrated in detached *Arabidopsis* leaves could be rapidly oxidized in 24h in the dark (40% of ascorbate degraded; pool size is constant under light). In contrast, in leaves of woodsorrel, degradation occurred at the same rate in light or darkness (respectively 45% and 55% of total radioactivity recovered in oxalate; Yang and Loewus, 1975).

Solanum lycopersicum is a model plant and one of the largest crops in the world. No information on either degradation products or the degradation rate is available in tomato. In this study, the aims were (i) to determine which degradation products accumulate in tomato leaves; (ii) to evaluate the impact of ascorbate pool size on its degradation rate; (iii) to assay potential control of the degradation rate by the activity of ascorbate recycling (by manipulation of MDHAR activity in transgenic plants). This is the first study in tomato aiming at characterizing ascorbate degradation products and degradation rate under the influence of both environmental and genetic factors.

Materials and methods

Plant material and growth conditions:

Solanum lycopersicum L. variety West Virginia 106 (cherry tomato) cotyledons were transformed as previously described by (Gest et al., 2013). Plantlets overexpressing MDHAR were labelled sx lines in this paper. Plantlets underexpressing MDHAR were labelled mds lines in this paper. Wild type plantlets were used as reference (WT). Tomato plantlets used for radiolabelled experiments were grown in a greenhouse located at the University of Edinburgh, Scotland. Tomato plantlets used for GC-MS analysis were grown in climatic chambers located at INRA, Avignon.

Tomato plantlets were acclimated for 2 weeks under short-days (i.e. 8h light/16h dark) in low light conditions ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and then a batch of plantlets was placed in high light conditions ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) for 7 days while another batch stayed in low light for 7 days. A period of darkness for 48h was applied before final sampling to evaluate the effect of ascorbate pool size on ascorbate degradation rate.

Chemicals:

Solid L-[1- ^{14}C] ascorbic acid (0.52 or $0.407 \text{ MBq}.\mu\text{mol}^{-1}$) from GE Healthcare (UK) was dissolved in water, aliquoted and stored at -80°C until required.

Incubation of tomato leaves with ^{14}C -mannitol or ^{14}C -ascorbate:

Tomato leaves were picked at 9am and quickly transferred into $20\mu\text{l}$ of [^{14}C]-Mannitol or [^{14}C]-ascorbate diluted in water. Pulse-chase incubation was performed. A constant air circulation was maintained during the whole incubation, thus after approximately 1h (when detached leaves had totally absorbed the radioactive solution), tomato leaves were transferred to water. A first experiment was carried out to investigate the localization of radioactive mannitol and ascorbate derivatives during 24h (Tf) of metabolism under darkness, with sampling performed after the complete absorption of radioactive solution (T0) and after 6h (Ti) for an intermediate analysis. Tomato leaves were placed in contact with film (Kodak BioMax MR-1) to perform autoradiography. In a second experiment, we followed radioactive ascorbate metabolism and catabolism in single leaflet kept under darkness for 24h and 48h. Sampling was performed as per the following time course: after 1 min of incubation, 30min, 1h, and then after 2h, 3h, 4h, 6h, 8h and 24h (Tf) in water. Tomato leaflets were immediately stored at -80°C before grinding.

Extraction of ascorbate derivatives:

Tomato samples were first weighed and then ground to powder in liquid nitrogen. Powder was homogenized in $150\mu\text{l}$ of 15% formic acid to extract ascorbate derivatives. $10\mu\text{l}$ of acid supernatant was analyzed by High Voltage Paper Electrophoresis (HVPE); the remaining volume was stored at -80°C before scintillation counting. After quick rinses with 15% formic acid and water, pellets were then treated with 1M sodium hydroxide (NaOH) to extract the basic fraction and, after quick rinses with 1M NaOH and water, with 2M Trifluoroacetic acid (TFA). Half of the supernatant obtained from basic extraction was stored at -80°C before scintillation counting. Half of the 'basic' supernatant was dialysed against distilled water ($2 \times 12\text{h}$) in Thermo Scientific dialysis tubes. Dialysis was performed to trap polymers. TFA was volatilized to dryness using a Speed-Vac, and extracts ($10\mu\text{l}$) were analyzed on High-Voltage Paper Electrophoresis (HVPE). Radioactivity from all extracts was quantified by scintillation counting.

High-voltage paper-electrophoresis (HVPE):

HVPE is particularly valuable for kinetic analyses of unstable radiolabeled organic acids such as ascorbate (Green and Fry, 2005b). Samples were dried on Whatman No.3 paper and electrophoresed in a volatile buffer at pH6.5 (acetic acid-pyridine-water, 1:33:300 by volume, containing 5mM EDTA) for 30min at 3.0kV or at pH2.0 (formic acid-acetic acid-water, 1:35:355 by volume) for 1h at 3.0kV. The papers were cooled to 20-25°C with toluene (pH6.5) or white spirit (pH2.0) during the run. Orange G was loaded with the samples and used as an internal reference marker. Electrophoretic mobilities were reported as m_{OG} values (mobility corrected for electro-endo-osmosis, relative to that of Orange G). Authentic markers were purchased from Sigma Chemicals (Sigma) except for 2,3-diketogulonate, compound C and compound E. Non-radioactive compounds were stained with AgNO₃ or Bromophenol Blue.

Detection of radioactivity:

[¹⁴C]-Labelled compounds were detected by autoradiography on Kodak BioMax MR-1 film. Paper electrophoretograms were cut into strips and transferred into 20ml Packard vials containing 2ml of Gold Star scintillant. Radioactive solutions were mixed with 10 volumes of 'OptiScint HighSafe'. ¹⁴C was quantified by scintillation counting (LS 6500 Beckman; Beckman Coulter Ltd, High Wycombe, UK).

Ascorbate content:

Measurements of ascorbic acid content were carried out as previously described (Stevens et al., 2006). Extractions were performed on ground powder stored at -80°C in ice-cold 6% tri-chloro-acetic acid (TCA). Spectrophotometric assay was based on the detection of dipyridyl-Fe²⁺ complexes following the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ by the reduced form of ascorbate present in the sample. Total ascorbate content (reduced + oxidized forms) was measured by mixing the sample with 5mM dithiothreitol (DTT) to reduce dehydroascorbate, prior to the assay. Each extract was measured in duplicate. The specificity of the assay has been checked by comparison with other known methods (Stevens et al., 2006) and by using ascorbate oxidase to remove all ascorbate in order to deduce other reductant background activity.

Extraction of ascorbate degradation compounds, derivatization and analysis using GC-MS:

Tomato leaves and fruit tissues were ground to powder in liquid nitrogen. Extraction was performed in 1000μl of previously degassed cold methanol with 120μl of internal standard ribitol (0.2mg.ml⁻¹ in water).

The mixture was extracted for 20 min at 4°C, and then mixed vigorously with 400μl of water. After centrifugation at 12000 rpm, the supernatant was reduced to dryness in a Speed-Vac.

Samples were immediately analyzed or stored for a maximum of 48h at -80°C. Dry residues were re-dissolved in 60µl of methoxyamine (20mg.ml⁻¹ in pyridine) and derivatized for 90min at 37°C. A 30min treatment at 37°C with 120µl of MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) was performed. 8µl of retention time standards (a mixture of dodecane, pentadecane, nonadecane, docosane) were added before trimethylsilylation. Samples were then loaded onto the AI 3000 autosampler. Sample volumes of 1µl were injected into the GC column using a hot needle technique. Analyses were carried out with a Trace GC Ultra-ISQ GC-MS system (Thermo France). Gas chromatography was performed on a Thermo TR-5MS column (20m length x 0.10mm inner diameter x 0.10µm film thickness). The injection temperature was set at 230°C and the ion source to 200°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.4ml.min⁻¹. The following temperature schedule was set: 3.70 min isothermal heating at 70°C, followed by a 7°C.min⁻¹ ramp to reach 280°C and a second ramp of 30°C/min to 320°C for a final heating of 1 min. Mass spectra were recorded at 6.6 scans.s⁻¹ with an *m/z* 50-650 scanning range. Mass spectra was cross-referenced with those in the Golm Metabolome Database (Kopka et al., 2005). Relative concentrations were determined by comparison with a ribitol internal standard.

Statistical analysis:

Data were submitted to a three way analysis of variance (ANOVA) taking into account the effect of genotype, environment and time and their interactions (XLStat software Addinsoft, France). Significant differences between treatments were assessed by a Fisher's test ($p < 0.05$).

Results

Distribution of [¹⁴C]-Ascorbate derivatives in tomato leaves

Autoradiographs of whole leaves exposed to [¹⁴C] are presented in **figure 2**. The distribution of radioactivity was monitored on leaves fed with [¹⁴C]-Ascorbate and [¹⁴C]-Mannitol in a pulse-chase experiment. The area of radioactivity obtained from [¹⁴C]-Ascorbate and [¹⁴C]-Mannitol differed largely. [¹⁴C]-Mannitol was detected in all parts of the tomato leaf with difficulty to resolve an advantageous location of transport and storage. No difference in terms of the radioactive area was detected during a time course with [¹⁴C]-Mannitol incubation. In contrast, [¹⁴C]-Ascorbate was mostly located in vascular tissue (both minor and major veins) of the leaf in the first hour of the experiment, then [¹⁴C]-Ascorbate, or its derivatives, was preferentially located in vascular tissue but also in the youngest leaflets.

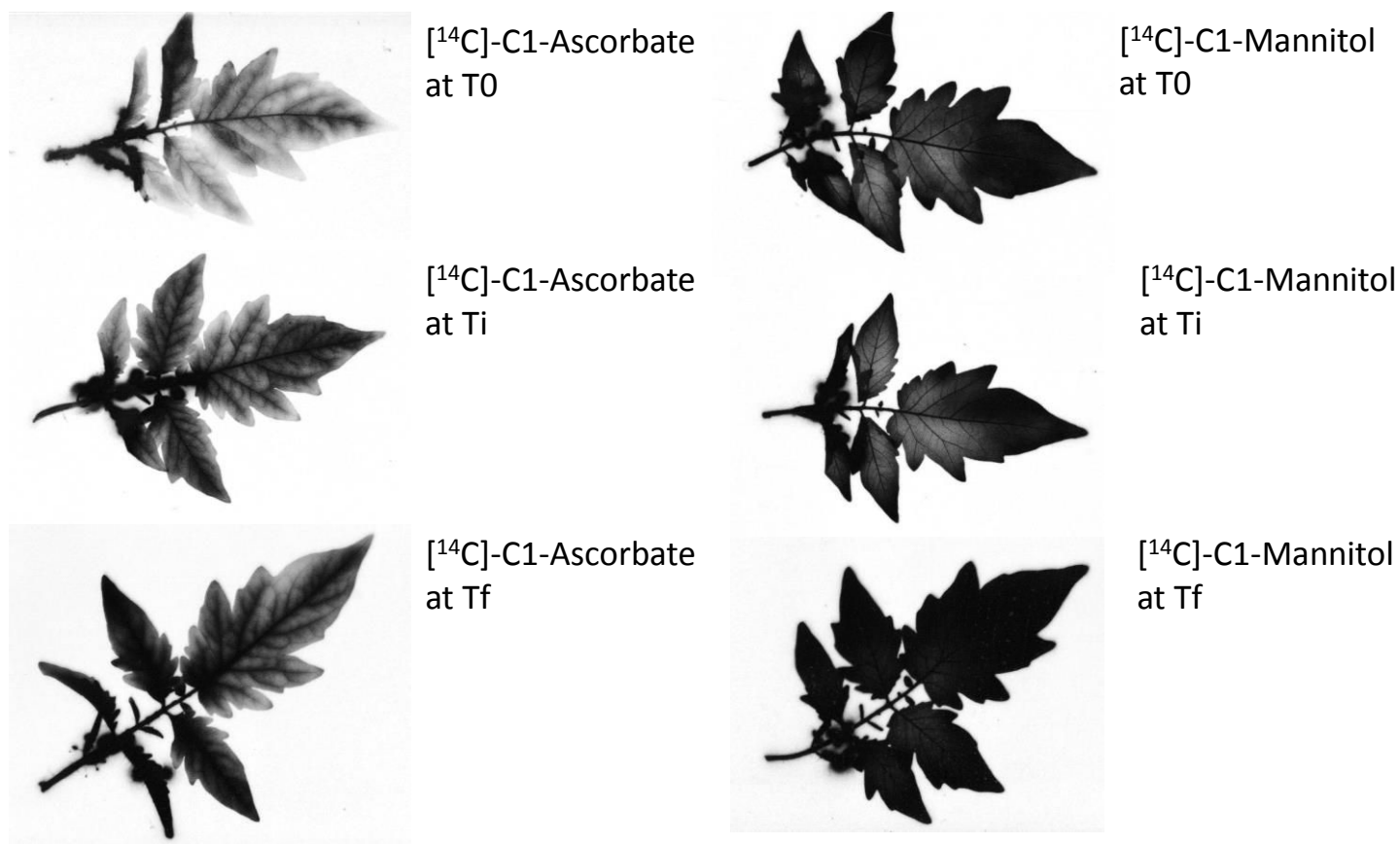


Figure 2: Representative pictures of autoradiographs showing radioactive label of [¹⁴C]-Mannitol and [¹⁴C]-Ascorbate after uptake by tomato leaves. Whole tomato leaves were detached from young plants and incubated with [¹⁴C]-Mannitol or [¹⁴C]-Ascorbate solutions for approximately 1h, then transferred at T0 into water for 24h. Sampling was carried out at T0 (complete absorption of radioactive solution), Ti (after 6h in water) and Tf (after 24h in water). Black label revealed the location of [¹⁴C] radioactivity within the leaf.

timecourse (min)	% of total radioactivity			
	60	240	480	1440
Acid extraction	95.05	92.58	92.00	88.50
Basic extraction	2.11	2.88	2.54	2.85
Polymers	0.02	0.04	0.05	0.15
Insoluble radioactivity	2.82	4.50	5.42	8.50

Table 1: Distribution of [^{14}C] in detached tomato leaves between soluble (acidic fraction, basic fraction (containing esters) and polymers) and insoluble fractions after incubation with [^{14}C]-Ascorbate in darkness. Leaves were incubated for 60min in radioactive solution then transferred to water for the next 24h. Results are expressed as percentage of the total radioactivity. Acid extraction includes 15% formic acid homogenization followed by centrifugation. Basic extraction was performed by adding 1M NaOH to the pellet after acid extraction. Polymers were trapped during dialysis. Insoluble radioactivity was estimated after a 2M TFA treatment on tomato pellets.

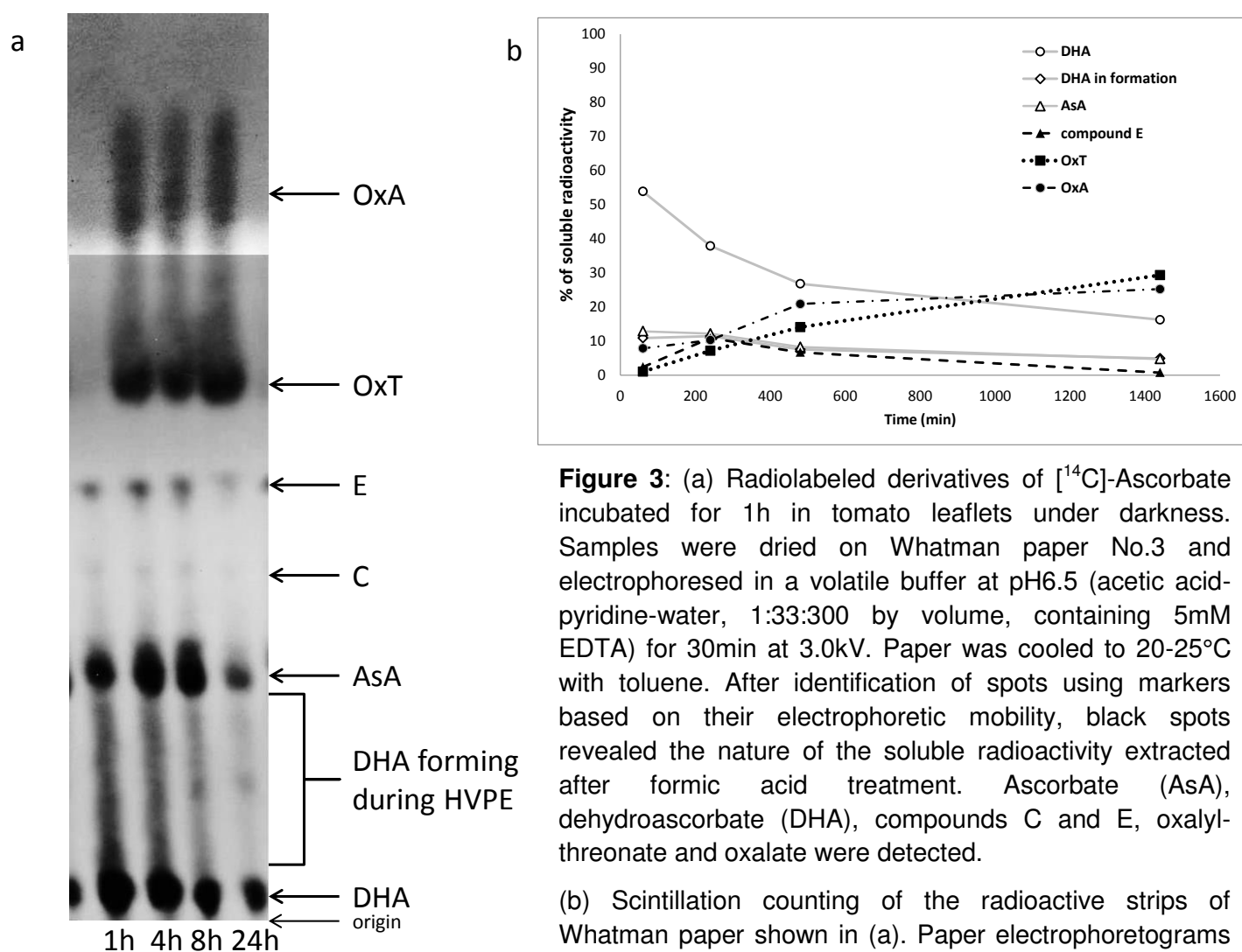


Figure 3: (a) Radiolabeled derivatives of [^{14}C]-Ascorbate incubated for 1h in tomato leaflets under darkness. Samples were dried on Whatman paper No.3 and electrophoresed in a volatile buffer at pH6.5 (acetic acid-pyridine-water, 1:33:300 by volume, containing 5mM EDTA) for 30min at 3.0kV. Paper was cooled to 20-25°C with toluene. After identification of spots using markers based on their electrophoretic mobility, black spots revealed the nature of the soluble radioactivity extracted after formic acid treatment. Ascorbate (AsA), dehydroascorbate (DHA), compounds C and E, oxalyl-threonate and oxalate were detected.

(b) Scintillation counting of the radioactive strips of Whatman paper shown in (a). Paper electrophoretograms were cut into strips and transferred into 20ml Packard vials containing 2ml of Gold Star scintillant. ^{14}C was quantified by scintillation counting. Ascorbate (AsA) and dehydroascorbate (DHA) are shown as white symbols, major degradation compounds of ascorbate and dehydroascorbate are shown as black symbols: compound E, oxalyl-threonate (OxT) and oxalate (OxA). Results are expressed as percentage of total soluble radioactivity.

Due to the heterogeneity within the tomato leaf after 1h of incubation, the following experiments were done on single leaflets.

Nature of ascorbate degradation compounds in tomato leaves

As previous results have shown ascorbate degradation during night (Conklin et al., 1997), a 24h time course of sampling in darkness was carried out to assay metabolism and catabolism of [^{14}C]-Ascorbate in detached tomato leaflets. We used different extraction methods to detect location and identify ascorbate-derived compounds; the nature of the radiolabeled compounds and ^{14}C amounts present in both the soluble and insoluble (i.e. radioactivity still present in the pellet after formic acid and basic extractions) fractions were determined. The radioactivity recovered in each fraction as a percentage of the total radioactivity is shown in **table 1**. The basic soluble fraction (extracted after formic acid and hydrogen peroxide treatments) has been separated into two parts: [^{14}C]-labelling trapped in polymers, and [^{14}C]-labelling found as free esters. Little radioactivity was found in the basic fraction (<3%), mostly located in esters and inclined to be stable during the time course. We observed that soluble radioactivity (both acidic and basic fractions) slightly decreased with time. Part of the radioactivity (up to 8.5% after 24h of incubation) was trapped in the pellet after extraction with formic acid and sodium hydroxide during [^{14}C]-Ascorbate metabolism and/or catabolism. Tests with 2M TFA, a stronger acid which properties of volatility allow its use before HVPE, have been carried out on the pellet of tomato material previously incubated with [^{14}C]-Ascorbate in order to free potential molecules from calcium bonds notably. After extraction and volatilization of TFA, a white deposit is observed and HVPE carried out on this deposit gave us the information that compounds trapped into insoluble material were probably carboxypentonates (**Supplemental data Figure S1**). We also had the confirmation that among these compounds, none was oxalate.

Characterization of the nature of ascorbate-derived compounds in the acid fraction was performed by HVPE analysis at pH 6.5 and pH2.0 to allow better determination of degradation products through different electrophoretic mobility depending on the pH. The results from analysis at pH 6.5 are presented in **Figure 3 a**. Radioactive ascorbate derivatives are separated at pH6.5 into: ascorbate, dehydroascorbate oxalyl-threonate (OxT) and oxalate (OxA) predominantly, and compound E (derivative of DKG proposed by Green and Fry, 2005b). **Figure 4 a** shows the results of HVPE at pH2.0. At pH2.0, ascorbate and dehydroascorbate are not separated but cyclic-oxalyl-threonate (cOxT), diketogulonate (DKG) and compound C (derivative of DKG proposed by Green and Fry, 2005b) are identifiable, also oxalyl-threonate, oxalate and compound E (as in HVPE pH6.5).

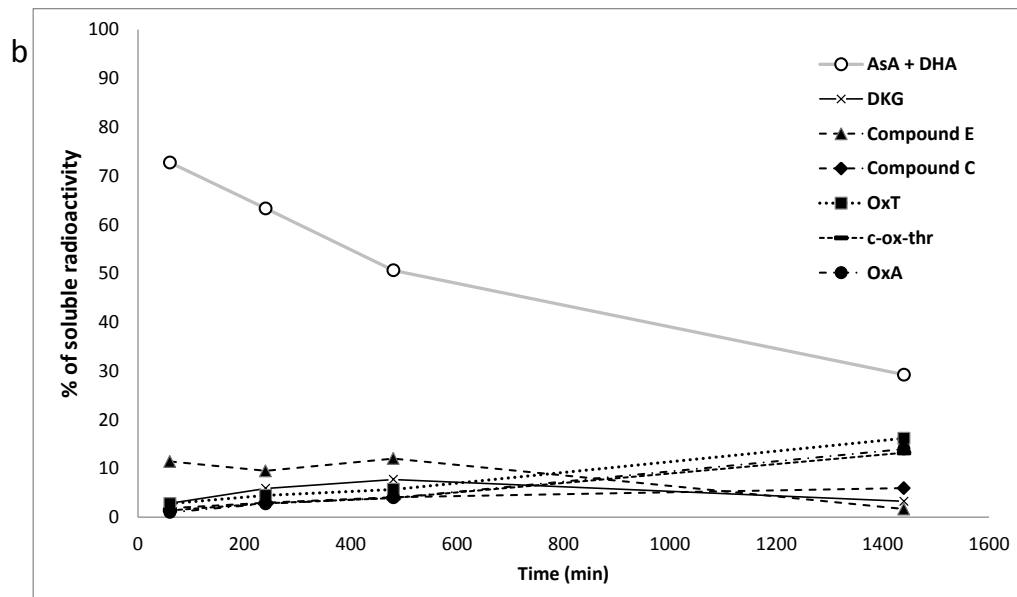
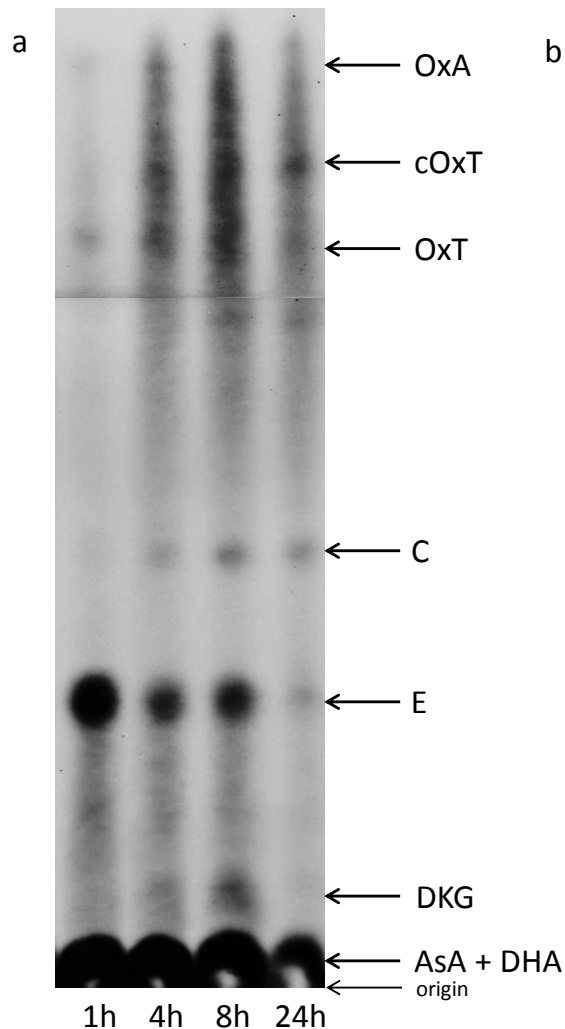


Figure 4: (a) Radiolabeled derivatives of [^{14}C]-Ascorbate incubated for 1h in tomato leaflets under darkness. Samples were dried on Whatman paper No.3 and electrophoresed in a volatile buffer at pH2.0 (formic acid-acetic acid-water, 1:35:355 by volume) for 1h at 3.0kV. Paper was cooled to 20-25°C with white spirit. After identification of spots using markers based on their electrophoretic mobility, black spots revealed the nature of the soluble radioactivity extracted after formic acid treatment. Ascorbate (AsA) and dehydroascorbate (DHA) were not separated (AsA + DHA) resulted in a large black spot. Compounds C and E, oxalyl-threonate (OxT), cyclic-oxalyl-threonate (cOxT) and oxalate (OxA) were detected.

(b) Scintillation counting of the radioactive strips of Whatman paper shown in (a). Paper electrophoretograms were cut into strips and transferred into 20ml Packard vials containing 2ml of Gold Star scintillant. ^{14}C was quantified by scintillation counting. Ascorbate and dehydroascorbate (AsA + DHA) are shown as white symbols, major degradation compounds of ascorbate and dehydroascorbate are shown as black symbols: DKG, compounds E and C, oxalyl-threonate (OxT), cyclic-oxalyl-threonate (cOxT) and oxalate (OxA). Results are expressed as percentage of total soluble radioactivity.

The intensity of the radioactive bands (pH 2.0 and pH 6.5) decreased for both ascorbate and dehydroascorbate spots over the time course while for oxalate, cyclic-oxalyl-threonate and oxalyl-threonate, spots intensities increased.

The percentage of [^{14}C]-Ascorbate and [^{14}C]-Dehydroascorbate decreased rapidly during the first 8h following incubation, giving evidence for the degradation of the ascorbate pool (**Figure 3 b**). For the next 16h of darkness, [^{14}C]-Ascorbate and [^{14}C]-Dehydroascorbate decreased more slowly to reach approximately 5% and 18% respectively of total radioactivity. Oxalyl-threonate and oxalate (free [^{14}C]-Oxalate only) are the two major compounds that increase during the time course. Oxalyl-threonate and oxalate appeared simultaneously to reach 30% and 25% of total soluble radioactivity respectively after 24h incubation. Compound E was also detected, and accumulated slightly during the first 8h of the experiment, then decreased. At pH2.0, the percentage of [^{14}C]-Ascorbate+Dehydroascorbate (**Figure 4 b**) constantly decreased during the time course from 70% to reach 30% of the soluble radioactivity. Oxalyl-threonate, oxalate and cyclic-oxalyl-threonate appeared simultaneously and increased constantly to reach 16%, 14% and 13% respectively after 24h. Compound E and DKG increased very rapidly during the first hour of the experiment, and then decreased between 8h of incubation and 24h. Compound C accumulated slightly during ascorbate metabolism. Based on the accumulation of all degradation compounds and disappearance of ascorbate and dehydroascorbate, we can evaluate the degradation rate of ascorbate in darkness, results are presented in **figure 5**. We evaluated that 38% of total radioactivity appeared in degradation products after 24h of darkness. The degradation rate of ascorbate was evaluated at 3% per hour. Degradation products from the DHA branch accumulated after 8 hours (23% of total radioactivity) and after 48 hours (up to 40% of total radioactivity) whereas products coming from the DKG branch did not accumulate in the soluble fraction during the time course and remained constant (5 to 10% of total radioactivity after the first hour of incubation).

Darkness activates degradation pathway without dependency with ascorbate pool size

To complete these labelling experiments, a GC-MS survey of ascorbate degradation end-products oxalate and threonate was carried out on tomato leaves subjected to different light and dark conditions. Tomato plantlets were grown under high light conditions ($1000\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) or low light conditions ($100\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) for 7 days. A batch of tomato plantlets was removed and stored for future analysis. A second batch of tomato plantlets (from both conditions) were placed in darkness for 48h. Reduced and oxidized ascorbate content were assayed by spectrophotometric analysis. Ascorbate content was higher in high light plantlets than in low light plantlets (**Table 2**) after 7 days of light treatment.

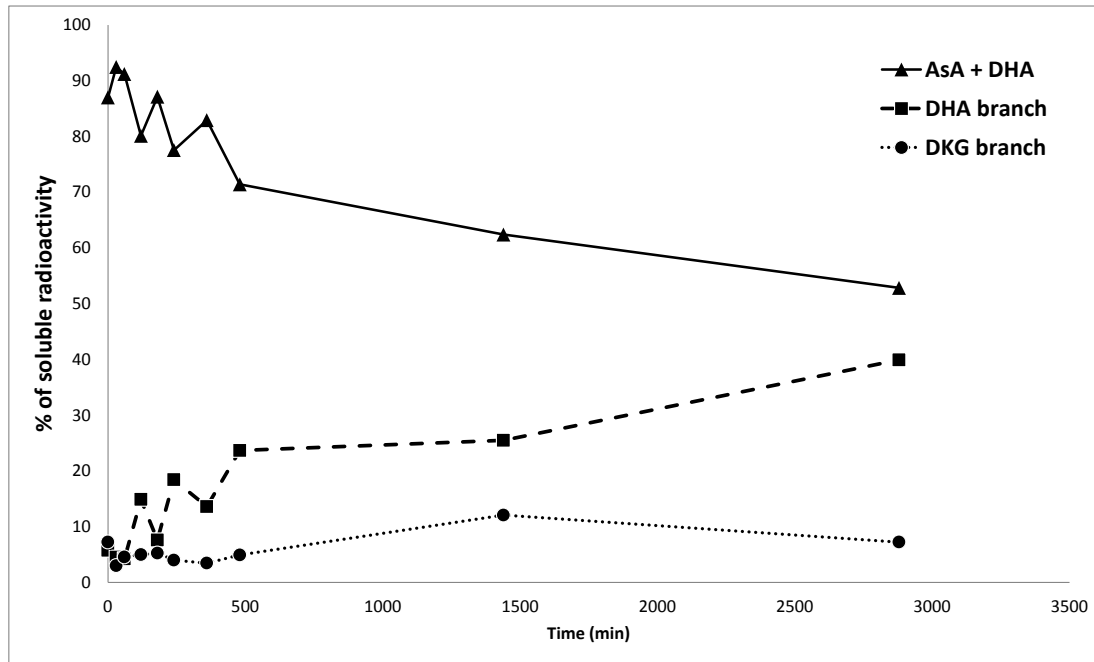


Figure 5: Degradation rate of ascorbate estimated in darkness in tomato leaves. Amounts of soluble radioactivity allocated into the ascorbate pool (AsA + DHA, triangles), degradation products from DHA (OxT, cOxT, OxA; squares), from DKG (DKG, C, E; circles). Results are expressed as a percentage of total soluble radioactivity.

	<i>mg/100gFw</i>			<i>arbitrary unit.gFw</i>		
	AsA	<i>p</i> <0.05	DHA	<i>p</i> <0.05	OxA+Thr	<i>p</i> <0.05
high light	127.9	<i>a</i>	26.7	<i>a</i>	9.1	<i>c</i>
48h dark	33.1	<i>b</i>	8.0	<i>b</i>	49.6	<i>a</i>
low light	41.8	<i>b</i>	8.5	<i>b</i>	5.9	<i>c</i>
48h dark	9.0	<i>c</i>	3.0	<i>c</i>	30.8	<i>b</i>

Table 2: Reduced ascorbate (AsA), dehydroascorbate (DHA) and degradation end-products oxalate (OxA) and threonate (Thr) in tomato leaves grown under high light (1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) or low light (100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), and after 48h of complete darkness. OxA and Thr were assayed by GC-MS analysis and expressed in arbitrary unit/gFw. Ascorbate and dehydroascorbate content were assayed by spectrophotometric analysis and expressed in mg/100gFw. Six replicates (independent plantlets) per conditions were used. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

During darkness, AsA and DHA decreased whereas oxalate and threonate accumulated for plantlets previously grown under both low light and high light. Reduced ascorbate content decreased to represent 20% of its initial content (22% for low light plantlets, 26% for high light plantlets). The oxidized form of ascorbate (DHA) decreased to represent 30% (high light) to 35% (low light) of its initial content after 48 hours of darkness.

Impact of a modification of MDHAR activity on degradation products

The impact of a modification of MDHAR activity on ascorbate degradation was evaluated using lines overexpressing or underexpressing MDHAR following the same protocol as described above. Results are presented in **figure 6**. Under darkness, we can observe the same pattern as mentioned above: the DHA degradation branch appeared more prevalent than the DKG branch as degradation products from the DHA branch accumulated. Accumulation of degradation products coming from DHA branch slightly decreased in silenced lines compared to overexpressing lines and WT (significantly decreased after 8h of incubation). No differences between lines were noticed for degradation products from the DKG branch. Results have been confirmed by GC-MS analysis on transgenic immature green fruits (**Supplemental data Figure S2**), OxA and Thr degradation products accumulated less in silenced lines compared to WT and overexpressing lines.

Discussion

Localization of ascorbate derivatives may reveal physiological roles in growth processes

Mannitol is a sugar alcohol not metabolized by many higher plants (Trip, 1975) and notably by tomato cells, but which has the ability to cross membranes and diffuse passively into tomato tissues. [^{14}C]-Mannitol was not preferentially located in a specific part of the leaf but diffused rapidly into the entire leaf showing an even pattern of distribution after the first hour. In contrast, [^{14}C]-Ascorbate was not distributed in the same way suggesting that it was metabolized by tomato cells and subject to active diffusion. Much of the radioactivity was located in the vascular tissues of the leaf and also in the youngest leaflets. Meristematic tissues contain high concentrations of AsA (Loewus et al., 1987) so that transport to growing cells is actively ruled by physiological states. The young leaflets used in our experiments are still actively growing and should represent a strong sink. The active transport or storage of [^{14}C]-Ascorbate into the growing parts of the leaf could be explained by the close link between ascorbate metabolism and cell expansion (Conklin et al., 2000; Dowdle et al., 2007; Pavet et al., 2005). Long distance transport of ascorbate in the phloem is suggested to occur (Franceschi et Tarlyn, 2002; Mozafar et Oertli, 1993), whose environment favours the stability and the transport of ascorbate.

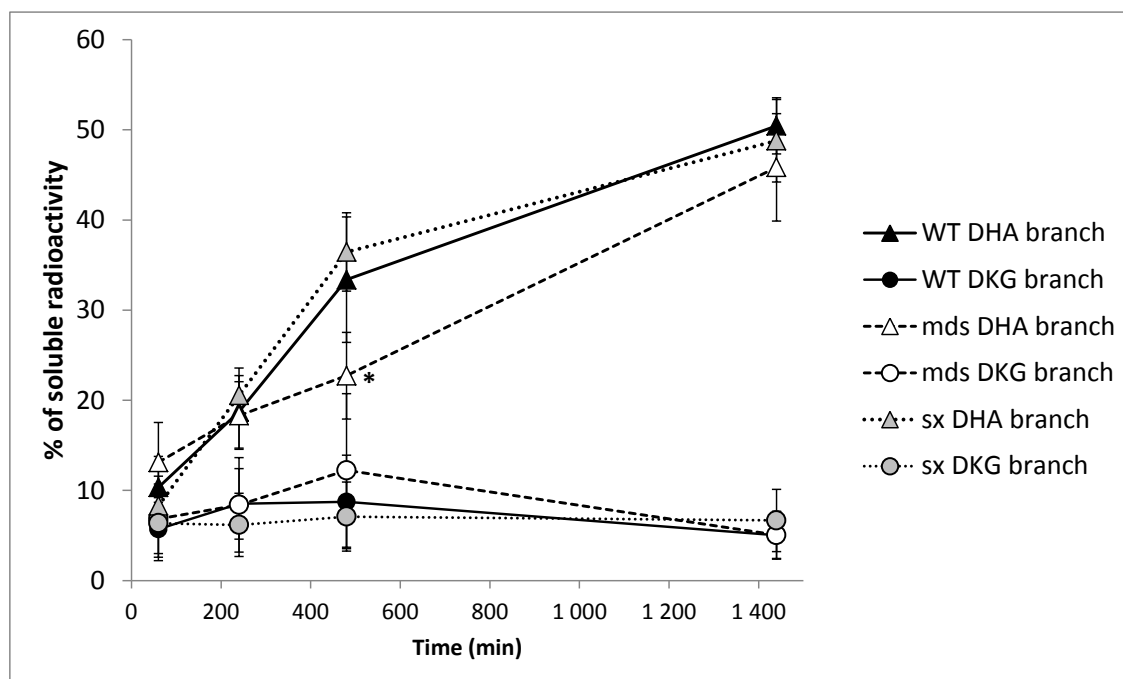


Figure 6: Accumulation of degradation products derived from [^{14}C]-Ascorbate (similar protocol to that of figure 3) in different transgenic lines modified for their MDHAR activity. Lines under-expressing MDHAR (mds; white symbols), overexpressing lines (sx; grey symbols). Wild type (WT) is used as reference (black symbols). Scintillation counting of total soluble radioactivity in degradation products coming from DHA (OxT, cOxT, OxA; triangles), from DKG (DKG, C, E; circles) during 24h of dark incubation with [^{14}C]-Ascorbate. Results (mean \pm standard deviation) are expressed as percentage of total soluble radioactivity. 6 replicates for sx and mds lines and 4 for WT line were used. One star indicates a significant difference with the wild type WT ($p < 0.07$).

Ascorbate in its reduced form is a negatively charged molecule at physiological pH thus it will not diffuse through cell membranes. Dehydroascorbate is a non-charged molecule but is not sufficiently lipophilic to passively diffuse across lipid membranes (Rose and Bode, 1993) and the presence of a regulated transport system must be involved. The presence of reduced ascorbate and DHA transporters has been proposed in many studies (Cai et al., 2014; Horemans et al., 1997; Miyaji et al., 2015) but not yet fully identified.

Major degradation products oxalate, threonate and the intermediate oxalyl-threonate are accumulated in tomato leaves in darkness

Characterization of the nature of other ascorbate-derived compounds in the soluble part did not reveal any compound related to tartrate metabolism in tomato leaves. Ascorbate degradation leads to the accumulation of oxalyl-threonate, cyclic-oxalyl-threonate and oxalate. Threonate (Thr) is also synthesized during ascorbate degradation, following the stoichiometry: 1 [^{14}C]-Ascorbate \rightarrow 1 [^{14}C]-Oxalate + 1 non-radioactive threonate (Green and Fry, 2005b). We can therefore assume that for every [^{14}C]-Oxalate molecule formed, a non-radioactive and undetectable threonate would have also been formed. Oxalyl-threonate and cyclic-oxalyl-threonate are intermediate compounds of the ascorbate degradation pathway from DHA (Green and Fry, 2005b). Oxalate and threonate are more stable and can accumulate in cells, and are thus well known as end-products of ascorbate degradation (Yang and Loewus, 1975). The proposed pathway has been proved to occur non-enzymatically *in vitro* but some steps can be accelerated by not yet fully identified enzymes involved in the hydrolysis of oxalyl-threonate to oxalate and threonate, oxidation of ascorbate to DHA, and probably oxidation of DHA and hydrolysis of cyclic-oxalyl-threonate.

Up to 8.5% of the total radioactivity remained trapped as carboxypentonates in the insoluble fraction. We identified compound C (and thus compound E which derives from compound C once de-lactonised) trapped in the insoluble material (**Supplemental data Figure S1**). Also, compounds C, E and DKG slightly accumulated into the soluble radioactivity. Compounds C and E are supposed to be carboxypentonates arising from diketogulonate (DKG) which is hydrolyzed (Parsons et al., 2011). Parsons et al proposed that compound E is 2-carboxy-L-threo-pentionate (2-carboxy-L-xylionate) and C is an epimeric mixture of 2-carboxy-L-xylonolactone and 2-carboxy-L-lyxonolactone. Production of such carboxypentonates *in vivo* are supposed to be highly dependent on ascorbate concentration as residual ascorbate inhibits compound C formation but also on the presence of H_2O_2 as highly oxidizing conditions divert DKG to more oxidative pathways (Parsons et al., 2011). Compounds C and E may not be metabolized further and appear to be quite stable end-products of ascorbate degradation.

Further analyses could be carried out to investigate their potential biological role, as they represent up to 8.5% of ascorbate labelling after 24h in darkness.

Some of the ascorbate degradation products from either DHA or DKG can contribute to H₂O₂ release. This phenomenon can occur *in vivo* (Kärkönen and Fry, 2006). Furthermore, oxalate can be degraded by the enzyme oxalate oxidase leading to the formation of CO₂ and H₂O₂ (Lane, 1994; Loewus, 1999). Recently, authors suggest that this reaction could, in association with ascorbate peroxidase activity, affect lignification (Burbridge et al., 2014). Oxalate oxidase is supposed to be light-regulated to release CO₂ when optimal activity of the photosynthetic apparatus is reached, thus providing an additional internal source of CO₂ for the plant. In addition to the compounds cited above, we concluded that H₂O₂ and CO₂ were probably released during the experiment (but not measured).

The degradation rate was evaluated at 38% in 24h in dark conditions in tomato leaflets. This result is comparable to those obtained by (Conklin et al., 1997) on *Arabidopsis* where 40% of ascorbate degraded in the dark in *Arabidopsis* detached leaves. Oxidation of the ascorbate pool was high during the 8 first hours, as ascorbate and dehydroascorbate decreased strongly. It is likely that during the first hours of experiment, oxidation of [¹⁴C]-Ascorbate may occur principally in the vascular tissues and the apoplast of the leaflet (as shown with radioactive repartition in whole leaves in **Figure 2**), thus at a higher degradation rate as enzymes of the degradation pathway have been only reported in the apoplast (Green et Fry, 2005b). These authors suggested that degradation pathway could also operate within the cell but without enzymes at a lower rate. In our experiment, ascorbate oxidation occurred at a lower degradation rate during the last 16h of experiment. We hypothesized that for [¹⁴C]-Ascorbate transported within the cell, degradation rate was slowed due to the lack of enzymes. This difference has to be confirmed in further experiments using cell suspension cultures or apoplast solution.

Mostly products coming from DHA degradation accumulated in the dark compared to those coming from DKG which remained at 5 to 10 % of radioactivity measured following the first hour of incubation. These products did not accumulate in the soluble fraction during ascorbate degradation under darkness, but might be trapped into insoluble material as mentioned above.

Ascorbate pool size does not affect the degradation rate of ascorbate in tomato leaves

Smirnoff and Wheeler highlighted the Mannose/Galactose pathway as the main biosynthetic pathway of ascorbate in plants (Wheeler et al., 1998). The recycling pathway controls the redox state of the ascorbate pool and is especially important during stress responses (Noctor et Foyer, 1998). Light intensity and light quality are the prominent

environmental factors influencing ascorbate biosynthesis and recycling (Li et al., 2009; Massot et al., 2012). The degradation rate of ascorbate in different light environments has never been studied before in tomato leaves. We found higher ascorbate content in plantlets kept under high light than those grown under low light in line with current observations on the activation of synthesis and recycling by light (Bartoli et al., 2006; Gautier et al., 2008). Oxalate and threonate increased during darkness but not during high light stress or low light treatment. Ascorbate levels of high light and low light plantlets were not similar at the beginning of the darkness treatment but the quantity of degradation products was exactly proportional to the size of the total ascorbate pool (representing 20% of the initial content after 48h). If we consider the ascorbate pool (AsA+DHA) final concentration (after 48h of treatment), it represents 56% of the initial content.

This result is comparable with those obtained using radiolabeled experiments, where we also noticed that the final concentration (after 48h in darkness) reached 53% of the initial radioactivity. These multiple experiments support the following hypothesis: the percentage degradation rate in darkness is independent of ascorbate content in tomato leaves. Under light, oxalate and threonate do not accumulate but this does not mean that degradation do not take place in the light as oxalate oxidase may be light promoted as mentioned above (Loewus, 1999).

Alteration of MDHAR activity lowers the degradation rate

The transgenic lines studied in this paper overexpressing MDHAR show a decrease in ascorbate levels in leaves and the silenced lines show an increase in ascorbate content both in leaves and fruits (Gest et al., 2013). The activity of this isoform of MDHAR is therefore negatively correlated to ascorbate content in tomato leaves. These results are not explained by changes in the expression of genes of the biosynthetic pathway, or by changes in the activity of enzymes involved in ascorbate recycling (dehydroascorbate reductase and glutathione reductase). The degradation rate of these transgenic lines may offer a possible explanation for this ascorbate phenotype. Lines silenced for MDHAR show a lower accumulation of degradation products in our experiments in darkness which may explain the higher ascorbate content in leaves. We conclude that degradation rate could be partially under the control of MDHAR recycling enzyme or the MDHA radical. We hypothesized that MDHAR activity could be correlated to ascorbate oxidase (AO) activity, which has the exact opposite activity to MDHAR and which is the first step of ascorbate oxidation in the apoplast. A diminution of gene expression coding for MDHAR may lead to a slower degradation rate due to a feedback control of MDHAR transcripts on AO gene expression.

Conclusions

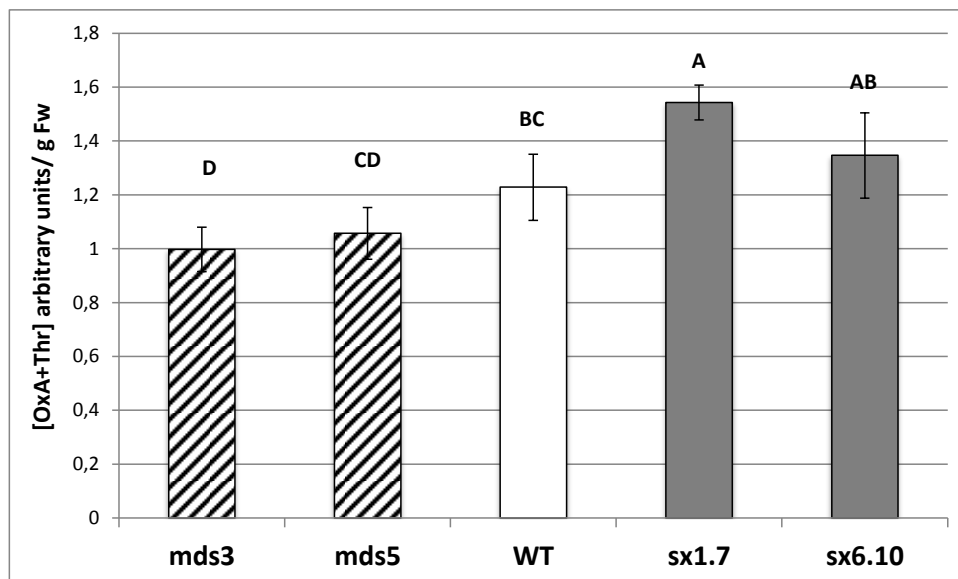
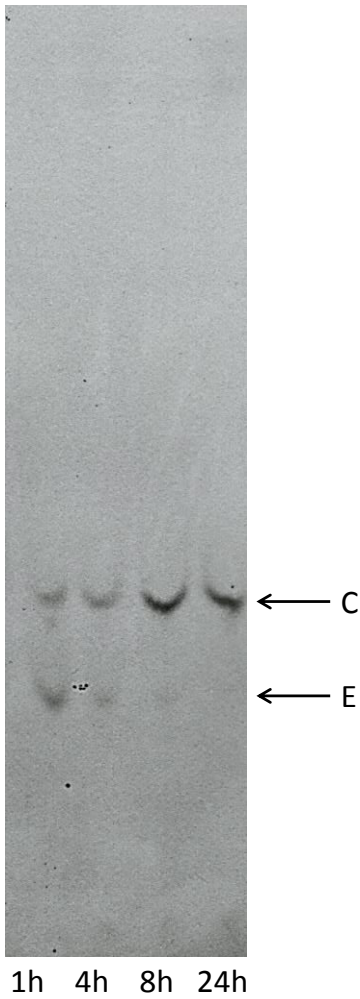
Ascorbate degradation in the light or dark was studied in tomato leaves. Oxalate, threonate and oxalyl-threonate were identified as end-products of ascorbate degradation (DHA branch). No tartaric acid was detected. The degradation rate was evaluated at 38% after 24h in dark conditions, with a major part of the degradation coming from DHA rather than DKG. Carboxypentonates were also detected and trapped in the insoluble tomato material. Further analyses will be performed to highlight their potential biological role. Degradation rate is independent of the initial ascorbate level and is under environmental control. The degradation rate could be partially under control of MDHAR, or proceed via production of MDHA radical, as lines under-expressing MDHAR enzyme showed a slight decrease in the degradation rate. In order to understand how to increase or stabilize ascorbate content in plants and fruits, controlling the degradation rate could be a good solution as degradation of ascorbate is non-reversible. Efficient ascorbate recycling will also enhance protection of the ascorbate pool from degradation.

Acknowledgements

We are grateful to the greenhouse experimental crew of Edinburgh University and to Janice Miller for her helpful assistance in radiolabeling experiments. We thank Gisele Riqueau for her technical assistance at INRA Avignon. The PhD of Vincent Truffault was financed by INRA and the Provence-Alpes-Côte d'Azur region. We thank Academie d'Agriculture de France for the funding of my stay in the Edinburgh Cell Wall Group.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental data Figure S1: Accumulation of insoluble [^{14}C]-Ascorbate derivatives in tomato leaves under darkness. After acidic extraction as described in figure 3, basic extraction and TFA treatment were performed. Samples were dried on Whatman paper No.3 and electrophoresed in a volatile buffer at pH6.5 (acetic acid-pyridine-water, 1:33:300 by volume, containing 5mM EDTA) for 30min at 3.0kV. Paper was cooled to 20-25°C with toluene. After identification of spots using markers based on their electrophoretic mobility, black spots revealed the nature of the insoluble radioactivity extracted after trifluoroacetic acid treatment. Radioactive compounds are compound C and compound E (Parsons et al., 2011).



Supplemental data Figure S2: Oxalate (OxA) and threonate (Thr) content in green tomato fruits of transgenic lines modified for their MDHAR activity. mds3 and mds5 are two independent lines under-expressing MDHAR (hatched bars). sx1.7 and sx6.10 are two independent lines overexpressing MDHAR (grey bars). Wild type (WT) is used as reference (white bar). Oxalate and threonate were assayed by GC-MS and expressed in arbitrary unit/gFw. 5 replicates were used per genotype. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

References

- Bartoli C.G., Yu J., Gómez F., Fernández L., McIntosh L., Foyer C.H.** (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**:1621–1631.
- Burbridge E., Rasmussen S.K., Bernier F., Kristensen B.K., McCabe P.F., Dix P.J.** (2014) Altered Activity of Peroxidase and Oxalate Oxidase Influences Lignification in Transgenic Tobacco. *The Open Plant Science Journal* **8**:1–8.
- Cai X., Ye J., Hu T., Zhang Y., Ye Z., Li H.** (2014) Genome-wide classification and expression analysis of nucleobase–ascorbate transporter (NAT) gene family in tomato. *Plant Growth Regulation* **73**:19–30.
- Conklin P.L., Pallanca J.E., Last R.L., Smirnoff N.** (1997) L-Ascorbic Acid Metabolism in the Ascorbate-Deficient *Arabidopsis* Mutant *vtc1*. *Plant Physiology* **115**:1277–1285.
- Conklin P.L., Saracco S.A., Norris S.R., Last R.L.** (2000) Identification of Ascorbic Acid-Deficient *Arabidopsis thaliana* Mutants. *Genetics* **154**:847–856.
- DeBolt S., Cook D.R., Ford C.M.** (2006) L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:5608–5613.
- DeBolt S., Hardie J., Tyerman S., Ford C.M.** (2004) Composition and synthesis of raphide crystals and druse crystals in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon: Ascorbic acid as precursor for both oxalic and tartaric acids as revealed by radiolabelling studies. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **10**:134–142.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnoff N.** (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* **52**:673–689.
- Dumville J.C., Fry S.C.** (2003) Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta* **217**:951–961.
- Franceschi V.R., Nakata P.A.** (2005) CALCIUM OXALATE IN PLANTS: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* **56**:41–71.
- Franceschi V.R., Tarlyn N.M.** (2002) L-Ascorbic Acid Is Accumulated in Source Leaf Phloem and Transported to Sink Tissues in Plants. *Plant Physiology* **130**:649–656.
- Gautier H., Diakou-Verdin V., Bénard C., Reich M., Buret M., Bourgaud F., Poëssel J.L., Caris-Veyrat C., Génard M.** (2008) How Does Tomato Quality (Sugar, Acid, and Nutritional Quality) Vary with Ripening Stage, Temperature, and Irradiance? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:1241–1250.
- Gest N., Garchery C., Gautier H., Jiménez A., Stevens R.** (2013) Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnology Journal* **11**:344–354.
- Green M.A., Fry S.C.** (2005a) Apoplastic degradation of ascorbate: Novel enzymes and metabolites permeating the plant cell wall. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **139**:2–7.
- Green M.A., Fry S.C.** (2005b) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**:83–87.

- Hamner K.C., Bernstein L., Maynard L.A.** (1945) Effects of Light Intensity, Day Length, Temperature, and Other Environmental Factors on the Ascorbic Acid Content of Tomatoes. *The Journal of Nutrition* **29**:85–97.
- Hancock R.D., Viola R.** (2005) Biosynthesis and Catabolism of L-Ascorbic Acid in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**:167–188.
- Hellman L., Burns J.J.** (1958) METABOLISM OF L-ASCORBIC ACID-1-C¹⁴ IN MAN. *Journal of Biological Chemistry* **230**:923–930.
- Helsper J.P., Loewus F.A.** (1982) Metabolism of L-Threonic Acid in *Rumex x acutus* L. and *Pelargonium crispum* (L.) L'Hér. *Plant Physiology* **69**:1365–1368.
- Horemans N., Asard H., Caubergs R.J.** (1997) The Ascorbate Carrier of Higher Plant Plasma Membranes Preferentially Translocates the Fully Oxidized (Dehydroascorbate) Molecule. *Plant Physiology* **114**:1247–1253.
- Kärkönen A., Fry S.C.** (2006) Effect of ascorbate and its oxidation products on H₂O₂ production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of Experimental Botany* **57**:1633–1644.
- Kay P., Wagner J.R., Gagnon H., Day R., Klarskov K.** (2013) Modification of Peptide and Protein Cysteine Thiol Groups by Conjugation with a Degradation Product of Ascorbate. *Chemical Research in Toxicology* **26**:1333–1339.
- Khan S.R.** (1995) Calcium Oxalate in Biological Systems. *CRC Press*.
- Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E., Dörmann P., Weckwerth W., Gibon Y., Stitt M., Willmitzer L., Fernie A.R., Steinhauser D.** (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21**:1635–1638.
- Laing W.A., Martínez-Sánchez M., Wright M.A., Bulley S.M., Brewster D., Dare A.P., Rassam M., Wang D., Storey R., Macknight R.C., Hellens R.P.** (2015) An Upstream Open Reading Frame Is Essential for Feedback Regulation of Ascorbate Biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **27**:772–786.
- Lane B.G.** (1994) Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *The FASEB Journal* **8**:294–301.
- Libert B., Franceschi V.R.** (1987) Oxalate in crop plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**:926–938.
- Li M., Ma F., Shang P., Zhang M., Hou C., Liang D.** (2009) Influence of light on ascorbate formation and metabolism in apple fruits. *Planta* **230**:39–51.
- Linster C.L., Van Schaftingen E.** (2007) Vitamin C. *FEBS Journal* **274**:1–22.
- Loewus F.A.** (1999) Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* **52**:193–210.
- Loewus F.A., Loewus M.W., Seib P.A.** (1987) Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **5**:101–119.
- Massot C., Bancel D., Lopez Lauri F., Truffault V., Baldet P., Stevens R., Gautier H.** (2013) High Temperature Inhibits Ascorbate Recycling and Light Stimulation of the Ascorbate Pool in Tomato despite Increased Expression of Biosynthesis Genes. *PLoS ONE* **8**:e84474.

- Massot C., Stevens R., Génard M., Longuenesse J.-J., Gautier H.** (2012) Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta* **235**:153–163.
- Melino V., Soole K., Ford C.** (2009) Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC plant biology* **9**:145.
- Miyaji T., Kuromori T., Takeuchi Y., Yamaji N., Yokosho K., Shimazawa A., Sugimoto E., Omote H., Ma J.F., Shinozaki K., Moriyama Y.** (2015) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in Arabidopsis. *Nature Communications* **6**.
- Mozafar A., Oertli J.J.** (1993) Vitamin C (Ascorbic acid): Uptake and Metabolism by Soybean. *Journal of Plant Physiology* **141**:316–321.
- Müller K., Linkies A., Vreeburg R.A.M., Fry S.C., Krieger-Liszkay A., Leubner-Metzger G.** (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology* **150**:1855–1865.
- Nakata P.A.** (2012) Plant calcium oxalate crystal formation, function, and its impact on human health. *Frontiers in Biology* **7**:254–266.
- Nakata P.A., McConn M.M.** (2003) Influence of the calcium oxalate defective 4 (cod4) mutation on the growth, oxalate content, and calcium content of *Medicago truncatula*. *Plant Science* **164**:617–621.
- Nemet I., Monnier V.M.** (2011) Vitamin C Degradation Products and Pathways in the Human Lens. *Journal of Biological Chemistry* **286**:37128–37136.
- Noctor G., Foyer C.** (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **49**:249–279.
- Parsons H.T., Yasmin T., Fry S.C.** (2011) Alternative pathways of dehydroascorbic acid degradation in vitro and in plant cell cultures: novel insights into vitamin C catabolism. *The Biochemical journal* **440**:375–383.
- Pavet V., Olmos E., Kiddle G., Mowla S., Kumar S., Antoniw J., Alvarez M.E., Foyer C.H.** (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**:1291–1303.
- Regulus P., Desilets J.-F., Klarskov K., Wagner J.R.** (2010) Characterization and detection in cells of a novel adduct derived from the conjugation of glutathione and dehydroascorbate. *Free Radical Biology and Medicine* **49**:984–991.
- Rose R.C., Bode A.M.** (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *The FASEB Journal* **7**:1135–1142.
- Saito K., Kasai Z.** (1968) Accumulation of tartaric acid in the ripening process of grapes. *Plant and Cell Physiology* **9**:529–537.
- Simpson G.L., Ortwerth B.** (2000) The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1501**:12–24.
- Smirnoff N., Wheeler G.L.** (2000) Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**:291–314.

- Stevens R., Buret M., Garchery C., Carretero Y., Causse M.** (2006) Technique for Rapid, Small-Scale Analysis of Vitamin C Levels in Fruit and Application to a Tomato Mutant Collection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:6159–6165.
- Trip, P., Krotkov, G., Nelson, C.D.** (1964) Metabolism of Mannitol in Higher Plants. *American Journal of Botany* **51**:828–835.
- Wagner G., Loewus F.** (1973) The Biosynthesis of (+)-Tartaric Acid in *Pelargonium crispum*. *Plant Physiology* **52**:651–654.
- Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N.** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**:365–369.
- Yang J.C., Loewus F.A.** (1975) Metabolic Conversion of L-Ascorbic Acid to Oxalic Acid in Oxalate-accumulating Plants. *Plant Physiology* **56**:283–285.
- Yew W.S., Gerlt J.A.** (2002) Utilization of L-Ascorbate by *Escherichia coli* K-12: Assignments of Functions to Products of the *yjf-sga* and *yia-sgb* Operons. *Journal of Bacteriology* **184**:302–306.
- Yu L., Jiang J., Zhang C., Jiang L., Ye N., Lu Y., Yang G., Liu E., Peng C., He Z., Peng X.** (2010) Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice. *Journal of Experimental Botany* **61**:1625–1634.

Dégradation de l'ascorbate dans le fruit de tomate

L'article précédent fait mention de la dégradation de l'ascorbate dans les parties végétatives (feuilles) de la tomate. La nature des produits ainsi que le taux de dégradation en fonction des conditions de l'environnement ont été étudiés. Nous nous sommes également intéressés au taux de dégradation de l'ascorbate dans la matrice fruit de tomate. En effet, la dégradation, entraînant une perte irréversible du pool d'ascorbate dans les cellules, il est important de proposer une étude dans le fruit afin de pouvoir anticiper l'influence de l'environnement sur la teneur en ascorbate dans le fruit. L'influence de la synthèse comme du recyclage dans le fruit ont été par le passé renseignés (Massot et al., 2013, 2012), le taux de dégradation s'avère être l'étape la moins connue pouvant jouer un rôle sur la teneur en ascorbate. Parmi les molécules ayant une plus-value nutritionnelle, la vitamine C s'avère être la plus sensible aux conditions climatiques en post-récolte (Lee and Kader, 2000). De plus, l'apport de vitamine C par l'alimentation chez l'homme est assuré en partie par l'ingestion des fruits de la tomate. Ces derniers présentent une concentration assez moyenne mais leur consommation par l'homme est élevée et échelonnée tout au long de l'année. La littérature nous éclaire sur la dégradation dans les fruits matures en conservation (après récolte) et met en lumière l'impact réel de la température du lieu de stockage. Les pertes seraient ainsi fortement accélérées sous de hautes températures (Yahia et al., 2007), mais également lorsque de basses températures sont appliquées sur les espèces sensible au « chilling », telle la tomate (Airaj et al., 2013; Stevens et al., 2008).

Afin de compléter ces analyses, nous avons cherché dans un premier temps à identifier les produits de dégradation dans le fruit par la technique d'analyse HVPE (décrite précédemment) et dans un second temps nous avons étudié l'impact de la température et de la lumière sur cette dégradation dans des fruits récoltés au stade vert mature en cours de maturation.

Matériel et méthodes

Des fruits verts en croissance et des fruits rouges sont récoltés. Des cubes de péricarpes sont prélevés et placés dans une solution de CaCl_2 -KCl ainsi que de l'ascorbate marqué sur le carbone 1. L'incubation de cette solution dans les péricarpes est réalisée pendant 24h. Des péricarpes sont prélevés et immédiatement congelés à -80°C après 1min, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h et enfin 24h d'incubation à température et lumière ambiante. Le tissu est ensuite broyé dans de l'acide formique et l'extrait est analysé par HVPE.

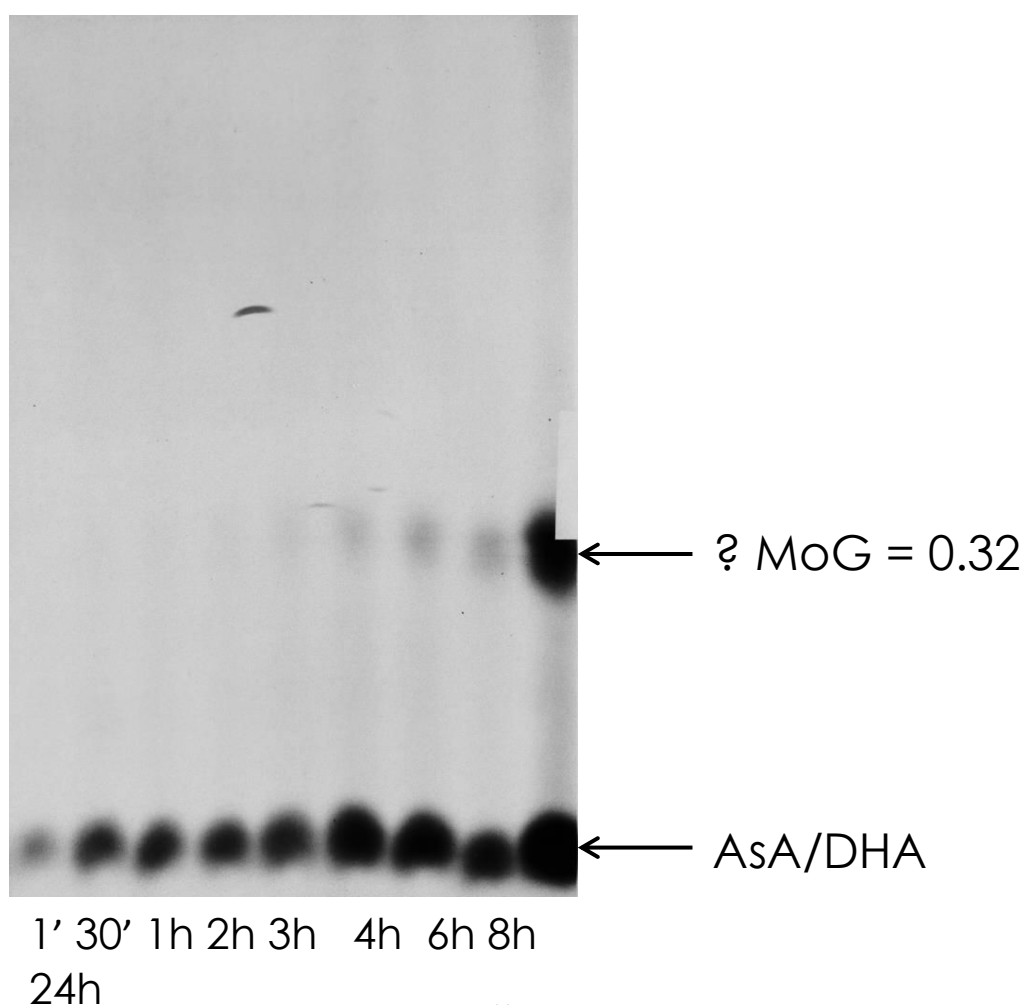


Figure 7: Kinetic study of the oxidation of [^{14}C]-Ascorbate incubated in red fruits of tomato. Experiment was performed under low light ($4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Soluble extracts were subjected to HVPE at pH2.0. AsA and DHA spots are revealed, as is unknown compound with MoG = 0.32

Dans une seconde expérimentation indépendante, des fruits verts matures sont prélevés et placés en chambre climatique pendant 48h. L'impact de l'environnement microclimatique est analysé par un dosage des composés de dégradation oxalate et thréonate (détectés et dosés par GC-MS) préalablement identifiés comme composés d'accumulation de la dégradation de l'ascorbate dans les feuilles de tomate. Deux conditions de luminosité (0 versus $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et deux conditions de température (12°C et 23°C) sont appliquées dans les chambres climatiques.

Résultats

La méthode d'analyse par HVPE révèle l'absence d'accumulation des produits de dégradation (précédemment identifiés dans les feuilles) dans les tissus des fruits rouges (**Figure 7**), mais également des fruits verts (**data not shown**). On distingue une accumulation au cours du temps dans les tissus des molécules ascorbate et déhydroascorbate, indiquant une rentrée effective dans les cellules de la solution marquée. Un composé inconnu associé à la distance relative 0.32 (distance par rapport au marqueur Orange G) est également détecté faiblement après 4h d'incubation, puis un pic très net à 24h. Le milieu d'incubation, contenant les enzymes possiblement libérés par le péricarpe, est analysé, mais ne révèle pas de différences avec les résultats cités au-dessus. A ce stade, il semble alors clair que la dégradation de l'ascorbate dans le fruit s'effectue à une vitesse très faible. On peut alors supposer que l'acidité certaine du fruit et l'activité des enzymes pourrait être à même de protéger efficacement le pool d'ascorbate d'une oxydation par l'environnement. Cependant, on peut émettre des doutes sur l'efficacité de l'incubation continue de la solution ^{14}C dans des tissus préalablement découpés, alors que l'intensité de la radioactivité dans le tissu continue d'augmenter au cours du temps. Une incubation plus longue sur des cubes de péricarpes devra être effectuée. Dans ces conditions très modérées d'oxydation du milieu (température ambiante, lumière ambiante) la dégradation n'est pas favorisée dans le fruit de tomate, et cette étude ne nous permet pas d'apprécier l'influence de l'environnement sur le taux de dégradation.

Dans la seconde expérimentation, différents régimes lumineux sont appliqués conjointement avec une faible température (12°C) ou une température ambiante (23°C) sur des fruits verts matures détachés de la plante. Le traitement dure 48h. On observe alors une concentration des composés oxalate et thréonate similaire pour l'ensemble des traitements (**Figure 8**). Alors que dans les tissus végétatifs nous avons observé une plus forte dégradation à l'obscurité et que l'impact de fortes températures sur la dégradation avait entraîné une élévation des teneurs en thréonate dans le fruit de tomate (Thèse Capucine Massot, 2010), nous ne notons pas d'influence de l'environnement sur la dégradation de l'ascorbate dans le fruit de tomate au stade vert mature.

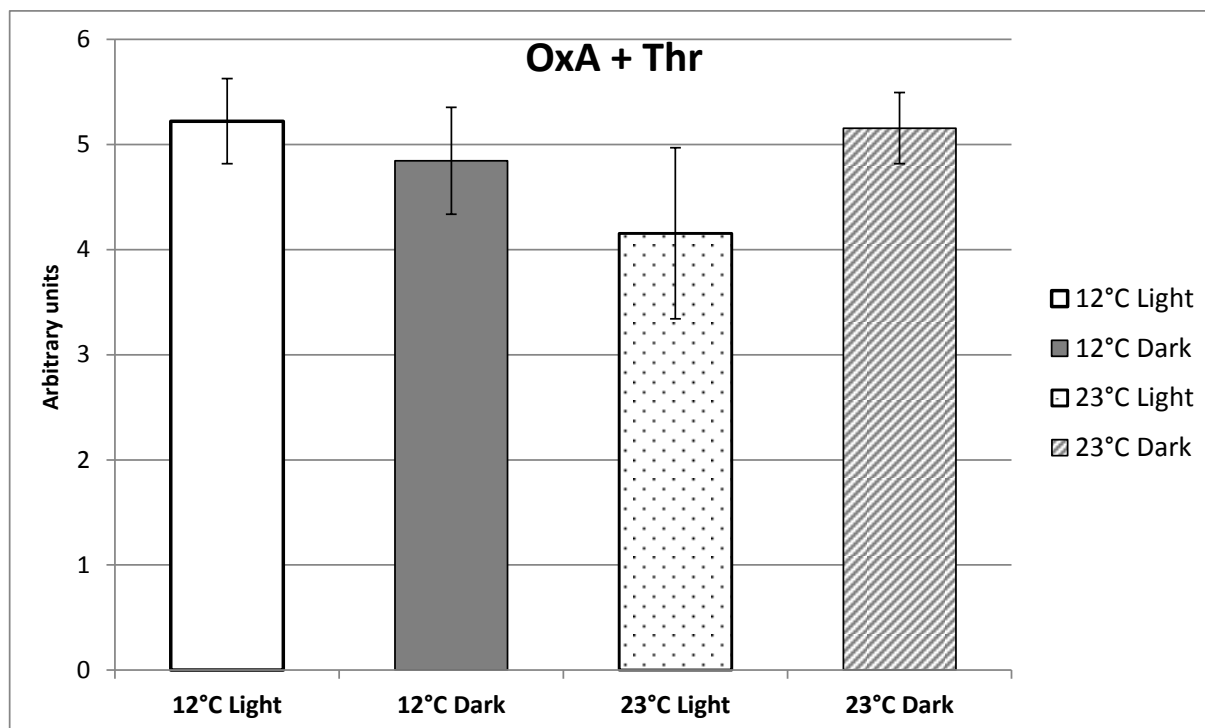


Figure 8: Oxalate and threonate concentration in off-vine mature green tomato fruits placed in climatic chambers for 48h. Four climatic environments were studied: under light ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) or darkness, at 12°C or 23°C. Oxalate and threonate are two end-products from ascorbate degradation and are assayed by GC-MS. Results expressed in arbitrary unit.gFw⁻¹ (relative concentration determined by comparison with internal standard).

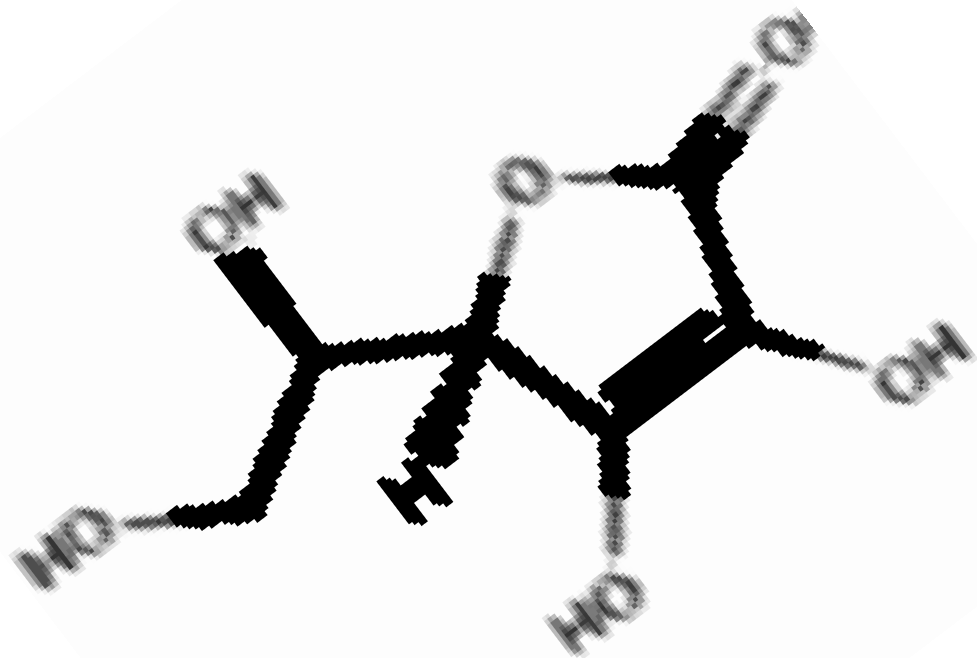
De plus, les concentrations relevées sont très faibles, indiquant une faible accumulation de ces produits dans le fruit vert mature.

Conclusion

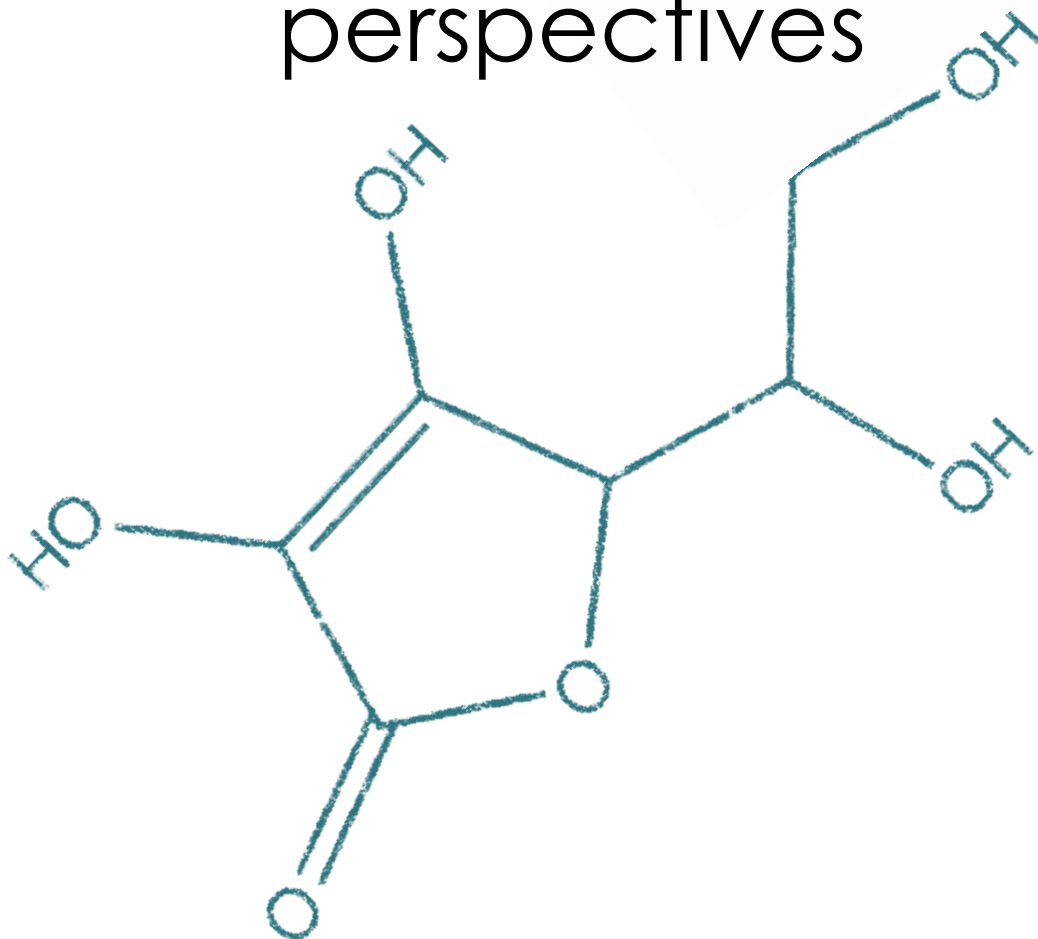
Au travers de ces diverses expérimentations, nous pouvons affirmer que la dégradation de l'ascorbate dans le fruit semble très faible en comparaison avec celle observée dans les feuilles de tomate. De nouvelles analyses sont toutefois nécessaires afin d'identifier le composé inconnu (MoG = 0.32) détecté par HVPE et seulement observé dans les fruits (non détecté dans les feuilles). Au travers des relations entre la dégradation et la croissance cellulaire mises en avant dans le chapitre précédent, le choix du stade de maturité du fruit sera crucial : les fruits verts en croissance pourraient être un bon choix afin de compléter les analyses sur l'impact de la dégradation de l'ascorbate sur la croissance cellulaire. Par ailleurs, des analyses de l'influence de l'environnement seront répétées sur des fruits rouges afin d'identifier l'impact des conditions de conservation sur les composés de dégradation préalablement identifiés. Afin de confirmer la nature des produits de dégradation dans le fruit, il serait bon de compléter les travaux effectués sur péricarpes par des études sur des extraits de liquide apoplastique de ces fruits ou de travailler sur un fruit entier (de Micro-Tom par exemple) en apportant le ^{14}C -ascorbate par incubation via le pédoncule.

Références

- Airaj H. El, Gest N., Truffault V., Garchery C., Riqueau G., Gouble B., Page D., Stevens R.** (2013) Decreased monodehydroascorbate reductase activity reduces tolerance to cold storage in tomato and affects fruit antioxidant levels. *Postharvest Biology and Technology* **86**:502–510.
- Lee S.K., Kader A.A.** (2000) Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* **20**:207–220.
- Massot C.** (2010) Analyse des variations de la teneur en vitamine C dans le fruit de tomate et rôle de l'environnement lumineux. *Thèse soutenue le 01/12/2010*.
- Massot C., Bancel D., Lopez Lauri F., Truffault V., Baldet P., Stevens R., Gautier H.** (2013) High Temperature Inhibits Ascorbate Recycling and Light Stimulation of the Ascorbate Pool in Tomato despite Increased Expression of Biosynthesis Genes. *PLoS ONE* **8**:e84474.
- Massot C., Stevens R., Génard M., Longuenesse J.-J., Gautier H.** (2012) Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta* **235**:153–163.
- Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zamir D., Causse M.** (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, cell & environment* **31**:1086–1096.
- Yahia E.M., Soto-Zamora G., Brecht J.K., Gardea A.** (2007) Postharvest hot air treatment effects on the antioxidant system in stored mature-green tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* **44**:107–115.



Discussion générale et perspectives



Discussion générale et perspectives

Les teneurs en ascorbate dans un tissu reflètent les interactions entre divers processus : sa biosynthèse, son recyclage, sa dégradation et son transport, le tout étant supposé sous le contrôle de l'environnement, du génotype et du stade de développement des organes. Alors que de nombreux travaux sur les voies de biosynthèse de l'ascorbate, son transport et son recyclage existent, très peu d'études se sont intéressées à la dégradation de l'ascorbate. Récemment, ses liens avec d'autres processus du métabolisme primaire (notamment la croissance) ont souligné la nécessité d'avoir une meilleure compréhension de ce mécanisme obscur. Au cours de ma thèse, j'ai ainsi mis en place des expérimentations afin de répondre aux objectifs suivants :

- Quelle est la nature des produits de dégradation de l'ascorbate dans les feuilles et les fruits de tomate ?
- Quel est l'impact de l'environnement sur le taux de dégradation ?
- Comment s'intègre la dégradation dans les processus de régulation des teneurs en ascorbate et existe-t-il des interactions entre recyclage et dégradation ?

Afin d'approfondir le lien entre le métabolisme (dont la dégradation) de l'ascorbate et croissance cellulaire, je me suis intéressé à des études originales du fonctionnement du couple d'enzymes MDHAR et AO (intervenant respectivement dans la réduction et l'oxydation de l'ascorbate) à l'aide de plantes transgéniques provenant de plusieurs cultivars de tomate. En effet, précédant mon arrivée au sein du laboratoire, des phénotypes de croissance ont pu être détectés au stade plantule et sur des fruits de lignées de tomate cerise sous exprimant MDHAR ou AO. Ces modifications affectent également le rendement des plantes, et pourraient donc représenter un bon levier pour augmenter la performance des plantes dans un contexte d'augmentation de la demande alimentaire, de réduction des surfaces et de limitation des intrants. Les objectifs de recherche suivants ont été abordés :

- Quels sont les modifications physiologiques et métaboliques responsables des phénotypes de croissance de nos lignées ?
- Ce fonctionnement est-il généralisé dans d'autres fonds génétique que la tomate cerise ?

L'ensemble de ces études a été réalisé en contrôlant finement les paramètres de l'environnement. Les interactions entre le métabolisme de l'ascorbate et l'environnement (notamment lumineux) sont nombreuses, rendant ainsi le contrôle de l'environnement crucial dans la réussite de ces expérimentations.

Nous aborderons dans cette synthèse la dégradation de l'ascorbate en premier lieu, avant de se pencher sur les liens qu'entretiennent le recyclage et la dégradation de l'ascorbate avec la tolérance au stress, la croissance cellulaire et l'établissement du rendement.

Dégradation de l'ascorbate

Le **chapitre 3** propose une expérimentation sur la régulation de la dégradation de l'ascorbate. La dégradation de l'ascorbate est un processus aboutissant une diminution de la taille du pool d'ascorbate. Cette perte peut être préjudiciable pour la plante alors que l'ascorbate sous sa forme réduite est impliqué dans un nombre conséquent de réactions cellulaires en tant que cofacteur (régulant ainsi la croissance et le développement de la plante), mais également à travers son rôle antioxydant (Smirnoff et Wheeler, 2000). Au travers de l'étude bibliographique, nous avons identifié que la connaissance actuelle du contrôle de la dégradation était faible, notamment chez la tomate. Le premier objectif était d'identifier la nature des produits de dégradation dans les feuilles et les fruits de tomate. D'après l'étude bibliographique, les produits d'accumulation provenant de la dégradation de l'ascorbate préalablement identifiés dans d'autres espèces végétales que la tomate sont le thréonate, l'oxalate et le tartrate. Nous avons ainsi dans un premier temps cherché à identifier ses produits par une analyse GC-MS ciblée sur ces métabolites (présentée en annexe du **chapitre 3**). Des fruits verts matures furent détachés de la plante et placés en enceinte climatique à diverses températures (12°C, 23°C et 32°C) et conditions de luminosité (obscurité ou lumière). Ces analyses préliminaires (présentées lors du congrès international POG 2013 à Varsovie) nous permirent d'affirmer que le tartrate ne s'accumulait pas dans les fruits de tomate, tandis que l'oxalate et le thréonate étaient détectés à de très faibles concentrations (ainsi qu'un troisième composé dont la structure chimique est proche de celle du thréonate, mais dont la nature précise était alors inconnue) et ce quelle que soit la condition environnementale appliquée sur ces fruits détachés. La méthodologie de cette étude, tant par le choix du stade de maturité du fruit que par l'analyse chimique choisie, nous amena à revoir le protocole. En effet, nous ne pouvons pas exclure qu'une partie de l'oxalate observé provienne d'une autre voie que celle de la dégradation de l'ascorbate comme observé chez le riz (Yu et al., 2010).

L'identification des produits de dégradation fut donc réalisée par HVPE, technique d'analyse permettant la visualisation et la quantification (avec l'aide de la radioactivité) des

produits d'accumulation mais également des produits intermédiaires (pouvant avoir une durée de vie assez courte) provenant de la dégradation de l'ascorbate. C'est avec cette technique que l'identification de la voie de dégradation dans l'apoplasme de cellules de Rosier a pu être proposée (Green et Fry, 2005a), ainsi que les études les plus précises sur la nature des composés (Green et Fry, 2005b; Parsons et al., 2011; Parsons et Fry, 2012, 2010). Dans le **chapitre 3**, nous observons que les composés oxalate, thréonate et l'intermédiaire oxalyl-thréonate (probablement le composé inconnu mentionné précédemment dans les analyses GC-MS) étaient accumulés, à l'obscurité, dans des feuilles de tomate. Ces composés dérivent de l'oxydation du déhydroascorbate. Nous confirmons également l'absence de tartrate provenant de l'ascorbate dans la tomate, tandis que l'hydrolisation du déhydroascorbate en diketogulonate, aboutit ensuite à la formation de carboxypentonates, faiblement accumulés mais néanmoins piégés dans la fraction insoluble. Un traitement avec un acide fort permet leur libération. Le rôle de ces carboxypentonates est totalement inconnu à ce jour. Le second objectif de ce chapitre était d'étudier l'impact de l'environnement sur le taux de dégradation. La condition environnementale choisie est la lumière, alors que métabolisme de l'ascorbate et conditions lumineuses (qualité et quantité de lumière) présentent des liens étroits (Bartoli et al., 2006; Dowdle et al., 2007; Li et al., 2013). Un point de régulation proposé est relié à l'expression de *vtc1* (Wang et al., 2013). Ce dernier montre en effet d'étroits liens avec les conditions lumineuses : les transcrits sont stable à la lumière et leur accumulation est corrélée avec une augmentation de la teneur en ascorbate. A l'obscurité, les transcrits sont instables et dégradés par le mécanisme post-traductionnel d'ubiquitination entraînant la dégradation par le protéasome, et en réaction la teneur en ascorbate est diminuée chez *Arabidopsis*. D'autres étapes similaires de régulation peuvent également exister (notamment les gènes *vtc2* et *vtc5* qui sont impliqués dans l'activation de la voie de biosynthèse) mais n'ont pas été mises en lumière pour le moment.

Nous avons évalué le taux de dégradation à l'obscurité : 37.6% de l'ascorbate exogène a été dégradé en 24h dans les feuilles de tomate, ce qui est comparable avec ce qui a été précédemment noté chez *Arabidopsis* (Conklin et al., 1997). L'étude a été répétée sous une luminosité très faible (correspondant à la lumière artificielle de la hotte aspirante; $4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ne permettant pas de conclure sur le taux de dégradation de l'ascorbate à la lumière. Néanmoins, nous avons réalisé une expérimentation sur des plantules placées sous forte intensité lumineuse ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou faible intensité lumineuse ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 7j. Nous observons alors que les concentrations en thréonate et oxalate ne sont pas affectées par le traitement lumineux, et sont assez faibles. Le passage à l'obscurité pendant 48h de ces plantules active la voie de dégradation alors que les concentrations en oxalate et thréonate augmentent fortement. Les teneurs en ascorbate sont quant à elle corrélées avec

l'intensité lumineuse, ce qui amène la conclusion suivante: le taux de dégradation est indépendant de la taille du pool d'ascorbate. Alors que la concentration en ascorbate effectue un rétrocontrôle sur la voie de biosynthèse (Laing et al., 2015), une telle régulation n'est pas observée sur la voie de dégradation.

Le contrôle génétique de la dégradation pourrait alors intervenir par l'activité de recyclage. En effet, l'étude de plantes transgéniques affectées au niveau de l'activité de l'enzyme de recyclage MDHAR révèle un lien intéressant à l'obscurité : le taux de dégradation est ainsi diminué dans les plantes sous-exprimant la MDHAR. Le radical MDHA, en tant que premier produit d'oxydation de l'ascorbate pourrait jouer un rôle de signal de l'état redox du pool tout entier, et entraîner une régulation de la dégradation.

La dégradation de l'ascorbate dans l'organe fruit se révèle peu étudiée, hormis chez le raisin où le tartrate dérivant de l'ascorbate joue un rôle primordial dans la vinification et ainsi la qualité gustative du produit, ce qui explique le nombre de publications sur le sujet (DeBolt et al., 2006, 2004; Melino et al., 2009). Dans les travaux de ma thèse, la dégradation dans le fruit de la tomate se révèle être très faible voire inexistante, alors qu'aucun produit de dégradation connu ne s'accumule dans nos analyses avec l'ascorbate marqué, mais également dans nos analyses GC-MS. La concentration du pool d'ascorbate marqué dans le fruit augmente continuellement au cours du temps, mais aucune oxydation du pool n'est observée. Une hypothèse pourrait être que l'acidité du fruit de la tomate stabilise la forme réduite et ne permettrait pas aux réactions (enzymatiques) de la voie de dégradation de se produire, agissant telle une protection du pool d'ascorbate. Cependant, nous pouvons émettre des doutes sur la méthodologie employée pour introduire l'ascorbate marqué dans le fruit : la découpe du péricarpe a pu libérer les enzymes des cellules du fruit mais également acidifier considérablement le milieu, empêchant toute réaction de se produire, alors que leur compartimentation dans le fruit entier amène potentiellement d'autres conclusions. La localisation de la dégradation est confirmée dans l'apoplasme (Green and Fry, 2005b) mais non étudiée à ce jour (même si les auteurs suggèrent que la dégradation pourrait intervenir les enzymes de l'apoplasme) dans d'autres compartiments cellulaires. Nous proposons de tester les différences de dégradation dans l'apoplasme ou dans les cellules par des travaux sur des extraits de liquide apoplastique ainsi que des cultures cellulaires de feuille et de fruit. Le rôle de l'ascorbate dans des stades plus précoces de la maturation et dans la réponse au stress en pré et en post-récolte pourra être étudié par une étude sur un fruit entier (de Micro-Tom par exemple) en incubant par le pédoncule. La dégradation de l'ascorbate dans le fruit semble très faible à court terme, des analyses devront être réalisées afin de conclure sur une dégradation de la qualité nutritionnelle de fruits en conservation post-récolte (reliées à une perte d'ascorbate). Avant la récolte, les transferts d'ascorbate depuis les feuilles vers le

fruit n'ont été mis en évidence de façon très importante que sur les stades précoces de développement du fruit (Badejo et al., 2012) et ne semblent pas prépondérants. Il n'est pas à exclure que les composés de dégradation soient également transportés entre organes ou stockés dans un compartiment cellulaire (la vacuole), avant de jouer par la suite un rôle métabolique précis (avec comme exemple, la régulation du calcium par l'oxalate, Franceschi et Nakata, 2005). Nous avons également observé que des dérivés d'ascorbate (carboxypentonates) pouvaient se retrouver piégés et ainsi être potentiellement non mobilisables par la cellule.

Le devenir des produits de dégradation et notamment leur transport entre compartiments cellulaires, entre cellules et entre organes pourra être renseigné par l'utilisation de la radioactivité : en marquant la molécule d'ascorbate, (i) nous pourrions ensuite incuber des cultures cellulaires afin d'identifier la compartimentation des produits dérivant de l'ascorbate et (ii) d'incuber cette solution d'ascorbate marqué dans une plante de Micro-Tom (ou à une plante simplifiée comprenant un apex, quelques feuilles et un bouquet de fruits, ainsi que le système racinaire) afin de suivre le transport de ces produits entre organes. La compréhension du devenir de ces produits dérivant de l'ascorbate devra être accrue, avec pour objectif à plus long terme, de proposer un modèle sur le rôle relatif de la synthèse, du recyclage et de la dégradation dans la régulation de la teneur en ascorbate en incorporant l'impact de l'environnement et du stade de développement. Un tel modèle permettrait de définir les conditions optimales de préservation du pool d'ascorbate en pré et en post-récolte.

De l'importance du recyclage de l'ascorbate sur la tolérance au stress

Dans l'optique de défendre ces cellules de dommages oxydatifs, la mobilisation de la molécule d'ascorbate est nécessaire à travers le transport de la molécule vers les organelles les plus affectés mais également au travers de sa synthèse, son recyclage et sa dégradation. La voie de biosynthèse de l'ascorbate est une voie qui requiert l'action de 9 enzymes et contient également des précurseurs clés des composés des parois cellulaires. Une augmentation de la teneur en ascorbate due à une activation de la voie de biosynthèse nécessite plusieurs heures (Bartoli et al., 2006), le bon déroulement du recyclage de l'ascorbate devient ainsi primordial dans les réactions de défense de la plante face à un stress fort et soudain. Nous avons confirmé cette hypothèse (dans le **chapitre 1**) à travers l'étude de la concentration en ascorbate de jeunes feuilles de plantules soumises à un fort rayonnement lumineux. Le stress lumineux provoqué a entraîné un certain nombre de réponses métaboliques, détaillées dans le **chapitre 1**, dont une augmentation forte de la

teneur en ascorbate. Cependant cette augmentation a été détectée seulement après 8 heures de stress, alors que les composés de dégradation de l'ascorbate ne s'accumulent pas en réaction à la lumière, indiquant un statu quo de l'état d'oxydation de l'ascorbate. Cela implique que le recyclage de l'ascorbate a été la première ligne de défense durant les premières heures du stress même si nous ne pouvons pas exclure l'intervention d'autres composés antioxydants. Nous allons tester cette hypothèse par des dosages d'activité des enzymes MDHAR et DHAR au cours des premières heures sous forte intensité lumineuse (dosage en cours). Le maintien de l'homéostasie redox de la cellule (c'est-à-dire l'équilibre entre les oxydants et les antioxydants) pourrait s'effectuer à l'aide des enzymes MDHAR et DHAR afin d'éviter des dégâts oxydatifs. La majorité des oxydations non enzymatiques subies par les cellules sont mono-électroniques, ce qui implique que le radical MDHA va être formé si l'ascorbate intervient comme antioxydant. De plus, les oxydations enzymatiques de l'ascorbate par l'APX et l'AO sont également mono-électroniques. Ce radical est régénéré en ascorbate réduit par l'enzyme MDHAR.

La corrélation entre l'activité de cette enzyme et la tolérance à un certain nombre de stress oxydants révèle son importance dans ces situations, corrélation moins évidente avec l'enzyme de recyclage DHAR. L'action et la localisation de MDHAR dans de multiples compartiments cellulaires (Lisenbee et al., 2005) permettraient à la plante de réagir rapidement à des variations de l'environnement. De plus, le bon déroulement de ce recyclage mono-électronique agit comme une protection du pool de glutathion alors que l'enzyme DHAR utilise le glutathion en tant que cofacteur, et ainsi un coût énergétique pour la cellule plus bas puisque la synthèse du glutathion nécessite la consommation d'ATP, et son recyclage consomme du NADPH.

Nous avons mis en lumière l'importance du métabolisme de l'ascorbate, et notamment des processus de recyclage, dans la tolérance au stress. Ainsi, le métabolisme de l'ascorbate est essentiel pour la défense de la plante, et son inhibition va affecter le métabolisme primaire ainsi que la croissance et le développement. Dans la partie suivante, nous discuterons des liens entre l'activité de recyclage de l'ascorbate et la croissance des cellules, ainsi que l'établissement du rendement.

Le couple MDHAR-AO au cœur des processus de croissance

Nous avons observé dans le **chapitre 1** un phénotype clair concernant les plantules sous exprimant l'enzyme MDHAR. Indépendamment du régime lumineux, la taille de la tige et des racines ainsi que la surface foliaire sont réduites pour ces génotypes. Ces différences de croissance ne sont pas retrouvées chez des plantes matures. De plus, le rendement de ces plantes est affecté sous conditions de croissance optimales, avec un effet plus prononcé

en situation de stress carboné. Des analyses plus poussées nous indiquent que la taille des cellules (chez le fruit tout du moins) est affectée, tandis que le nombre de cellules ne serait pas diminué. Nous ne pouvons pas exclure totalement l'hypothèse d'une réduction du nombre de cellules, alors que les coupes de cellules de fruits ont été réalisées sur des fruits au stade très précoce de 3 jours après anthèse (la durée de la division des cellules du fruit chez la tomate cerise étant estimée à 10 jours). Un retard de développement de ces fruits pourrait ainsi également être impliqué dans le phénotype malgré une absence de différence de la durée de maturation des fruits.

L'étude de la répartition de la biomasse nous révèle une légère diminution du système racinaire chez les lignées sous-exprimant l'enzyme MDHAR. L'expression du gène codant pour la MDHAR est particulièrement forte dans les racines (<https://genevestigator.com/>), une sous-expression de l'enzyme pourrait donc avoir un effet important sur la croissance et le métabolisme des racines. Si leur fonction de prélèvement de l'eau et des nutriments n'est pas assurée pour une raison de déficit de développement racinaire par exemple, la croissance de la plantule peut en effet être ralentie, comme observé dans nos lignées sous exprimant MDHAR. Il est donc impératif d'étudier le système racinaire en détail de ces lignées à l'avenir, avant d'exclure toute hypothèse résultant d'une perturbation du système racinaire dans les lignées sous exprimant MDHAR. La mise en place d'une culture hydroponique devrait être à même de nous fournir des informations sur le développement racinaire de ces lignées.

A l'inverse, aucun impact sur la croissance n'est détecté sur les géotypes sur-exprimant MDHAR, et ce sous différentes conditions environnementales. Il est particulièrement intéressant que des lignées transgéniques sous-exprimant l'enzyme ascorbate oxydase présentent également un phénotype croissance (l'exact opposé de celui décrit pour les plants sous-exprimant MDHAR), avec une taille de fruit plus grosse (là encore due à une taille des cellules affectée, et non un changement dans le nombre de cellules), une augmentation des teneurs en sucres solubles et une tolérance au stress carboné accrue. L'effet d'une sous-expression d'AO et d'une surexpression de MDHAR devrait aboutir de manière équivalente à une teneur en MDHA plus faible et un ratio AsA/MDHA élevé (en comparaison avec une lignée témoin), étant donné l'action conjointe de ces enzymes sur le couple AsA/MDHA. Malgré ces similitudes d'action, les phénotypes de ces lignées ne sont pas identiques (aucune différence n'est notée entre les lignées sur-exprimant MDHAR et les lignées témoins). Enfin, en comparaison, la sous-expression de la MDHAR devrait résulter à une teneur en MDHA forte et à un ratio AsA/MDHA faible (en comparaison avec une lignée témoin). Nous avons partiellement confirmé cela en dosant la teneur en MDHA par résonance paramagnétique électronique sur des lignées sous-exprimant et sur-

exprimant MDHAR : on remarque une teneur en MDHA respectivement plus élevée et plus faible en comparaison avec le témoin. Ces dosages doivent être analysés avec parcimonie (la méthode devra être validée puis optimisée), mais ils nous procurent tout de même cette première information. Des dosages du radical MDHA dans les lignées sous-exprimant AO devront également être réalisés.

Nous analysons donc le rôle de ces enzymes sur la croissance cellulaire. Nos résultats vont cependant à l'opposé de ce qui a été précédemment observé dans la littérature sur d'autres espèces. En effet, un apport exogène en MDHA stimule l'expansion cellulaire de cellules d'oignon (Gonzalez-Reyes et al., 1995), probablement par son utilisation comme accepteur d'électron par le cytochrome b561 (Asard et al., 2013), localisé dans les parois cellulaires, dans le transfert transmembranaire des électrons afin de promouvoir la croissance cellulaire. Nos lignées sous-exprimant MDHAR présentent une teneur en MDHA plus élevée mais ont une croissance cellulaire retardée, qui serait donc indépendante des effets du MDHA sur le cytochrome b561.

Les processus de division et de croissance cellulaire sont sous le contrôle des hormones, et notamment de l'auxine (tant au niveau des feuilles (Masuda, 1990) que du fruit ; Azzi et al., 2015). Le pool d'auxine disponible par la cellule dépend de sa biosynthèse (à partir du tryptophane) puis de son transport vers les cellules en croissance mais également de son état libre (formes actives) ou conjugué (formes inactives) avec des sucres (glucose, voire avec le *myo*-inositol) ou des acides aminés (Korasick et al., 2013). Il est avéré que l'équilibre entre les espèces oxydantes et les antioxydants est un fort signal régulant le métabolisme de l'auxine (Tognetti et al., 2012).

Enfin, les états d'oxydation des pools de la thioredoxine et du glutathion interviennent dans la régulation de l'auxine (Bashandy et al., 2011). Les mécanismes complets de la régulation de l'auxine ne sont à ce jour pas parfaitement compris, il est tout à fait probable que l'état d'oxydation de l'ascorbate joue également. La localisation et l'abondance de la molécule d'ascorbate dans les cellules en fait un candidat idéal de régulation du statut redox de la cellule. De plus, pour appuyer cette hypothèse, l'enzyme ascorbate peroxydase serait impliqué dans la formation d'auxine (Correa-Aragunde et al., 2013). Ainsi, dans le cadre du projet AgroBi (mené en marge de ma thèse), des différences d'expression des gènes entre les lignées sous-exprimant AO et celles sous exprimant MDHAR ont été relevées, sur un total de 241 gènes (**Annexe 3**). Parmi l'ensemble des gènes analysés, la plus forte différence d'expression entre les lignées précitées est observée pour le gène Solyc01g110680.2.1, gène associé à une famille de protéines en réponse à l'auxine. Une sous-expression est observé pour la lignée sous exprimant MDHAR, et une surexpression pour la lignée sous exprimant AO. De plus, Garchery et al mentionnent également une

activation de l'expression de 2 gènes liés au métabolisme de l'auxine dans les lignées sous exprimant AO (Garchery et al., 2013). Il semblerait donc que l'expression du couple MDHAR / AO intervienne dans le métabolisme de l'auxine, sans pour autant que le mécanisme ne soit précisément identifié : (i) nous avons observé une teneur plus élevée en tryptophane, précurseur de l'auxine, dans les lignées sous exprimant MDHAR, indiquant une accumulation dans les cellules de cet acide aminé qui pourrait peut-être être reliée à sa non-utilisation dans la synthèse d'auxine ; (ii) son transport vers les cellules en croissance pourrait être perturbé ; (iii) son activation après libération avec les espèces conjuguées pourrait être inhibée. Ce qui est particulièrement intéressant, ce sont les liens étroits qu'entretiennent l'auxine et l'enzyme AO.

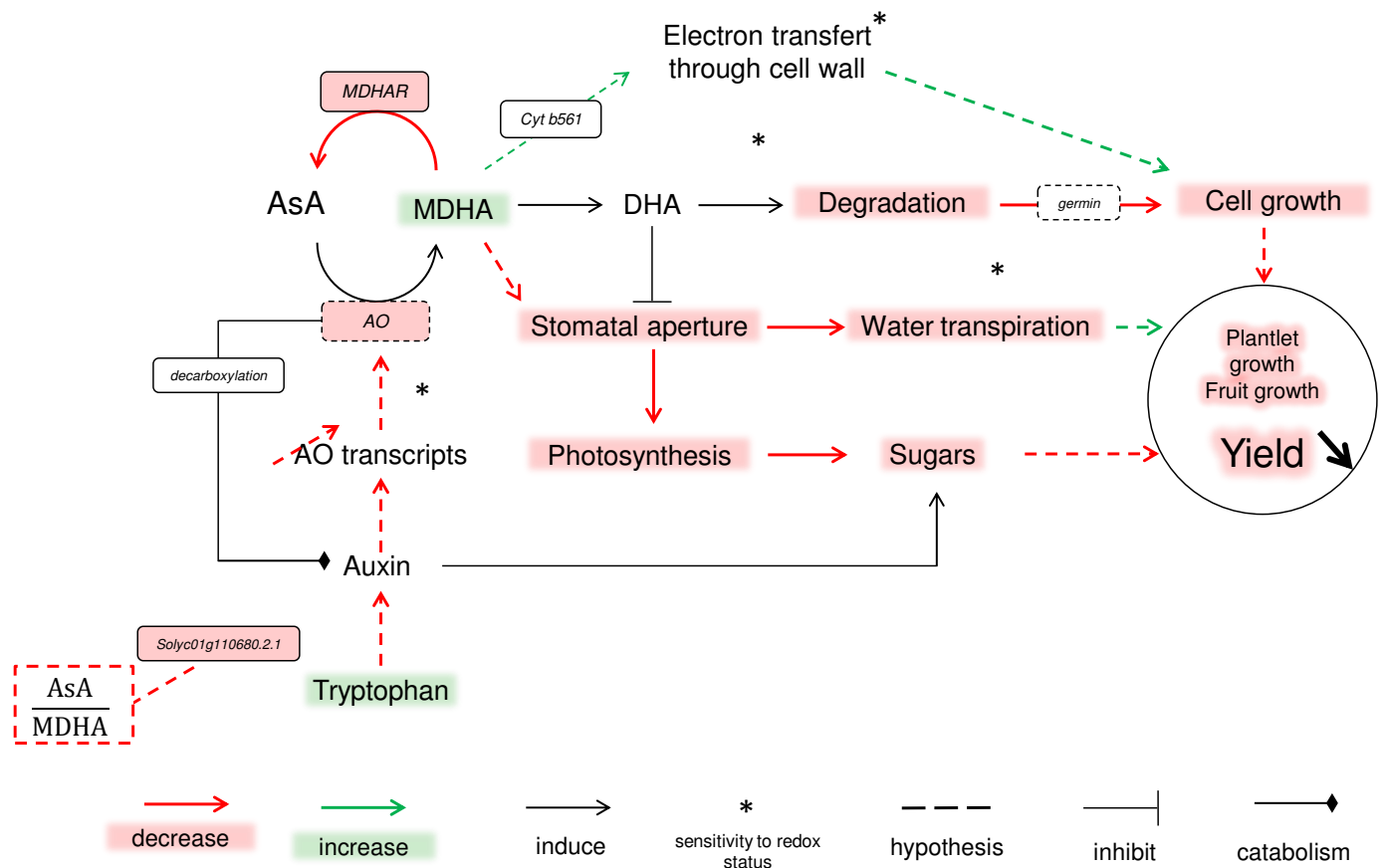
AO est activé par la lumière mais son activité semble, au premier abord, dangereuse pour la cellule (oxydation du pool d'ascorbate), même si de multiples études récentes mettent en avant ses fonctions bénéfiques dans la croissance et le développement (De Tullio et al., 2013) voire dans le contrôle d'un excès d'oxygène (De Tullio et al., 2007). La molécule d'auxine peut être facilement transportée et intervenir dans l'élasticité des parois cellulaires, où est également localisé AO, et cette présence d'auxine induit une augmentation au niveau transcriptionnel aboutissant à une activité AO plus forte (Esaka et al., 1992). Une augmentation de l'activité AO s'avère être corrélée avec la décarboxylation oxydative de l'auxine (soit son catabolisme), de sorte d'une boucle de régulation est formée (Kerk et al., 2000). Cette dégradation de l'auxine aurait pour but de forcer la cellule à ré-augmenter (par sa synthèse ou bien la libération de l'auxine conjugué avec des sucres) les teneurs en auxine dans les parois cellulaires ce qui favoriserait l'expansion cellulaire. L'expression de l'enzyme AO est corrélée avec la croissance cellulaire, à travers son rôle requis dans la transition entre division cellulaire et expansion cellulaire (Kato et Esaka, 1999).

Si l'on s'en tient au strict dosage de l'activité AO de nos lignées, à nouveau nos lignées transgéniques ne réagissent pas en accord avec cette publication: les lignées sous-exprimant l'enzyme AO voient la taille de leurs cellules augmenter. Cependant, la régulation de la croissance cellulaire est bien plus complexe. Comme présenté ci-avant, la croissance végétative est soumise à une régulation fine par les hormones, l'auxine mais également l'acide abscissique (ABA). Dans le **chapitre 1**, nous avons proposé l'existence d'une corrélation entre des teneurs faibles en sucres, l'hormone ABA et le métabolisme de l'ascorbate. Des liens entre le statut redox de l'ascorbate et les synthèses hormonales (ABA et auxine) existent (Esaka et al., 1992; Foyer et al., 2012; Kerchev et al., 2011) et pourraient expliquer la croissance retardée des plantules de lignées sous-exprimant MDHAR. Nous avons également imaginé (cas des lignées sous exprimant MDHAR), que la baisse d'activité de MDHAR pourrait entraîner une perte d'activité de AO, en quelque sorte que AO ne puisse

pas fonctionner sans une activité MDHAR de routine. Si une perte d'activité AO était observée chez ces lignées, la transition division cellulaire – expansion cellulaire s'en trouverait retardée et aboutirait au phénotype décrit (croissance ralentie des plantules). Cependant, nos mesures préliminaires d'activité AO chez les lignées sous-exprimant MDHAR ne révèlent pas de corrélation entre ces deux activités.

MDHAR silenced lines

$\frac{AsA}{MDHA}$ redox status decreases



AO silenced lines

$\frac{AsA}{MDHA}$ redox status increases

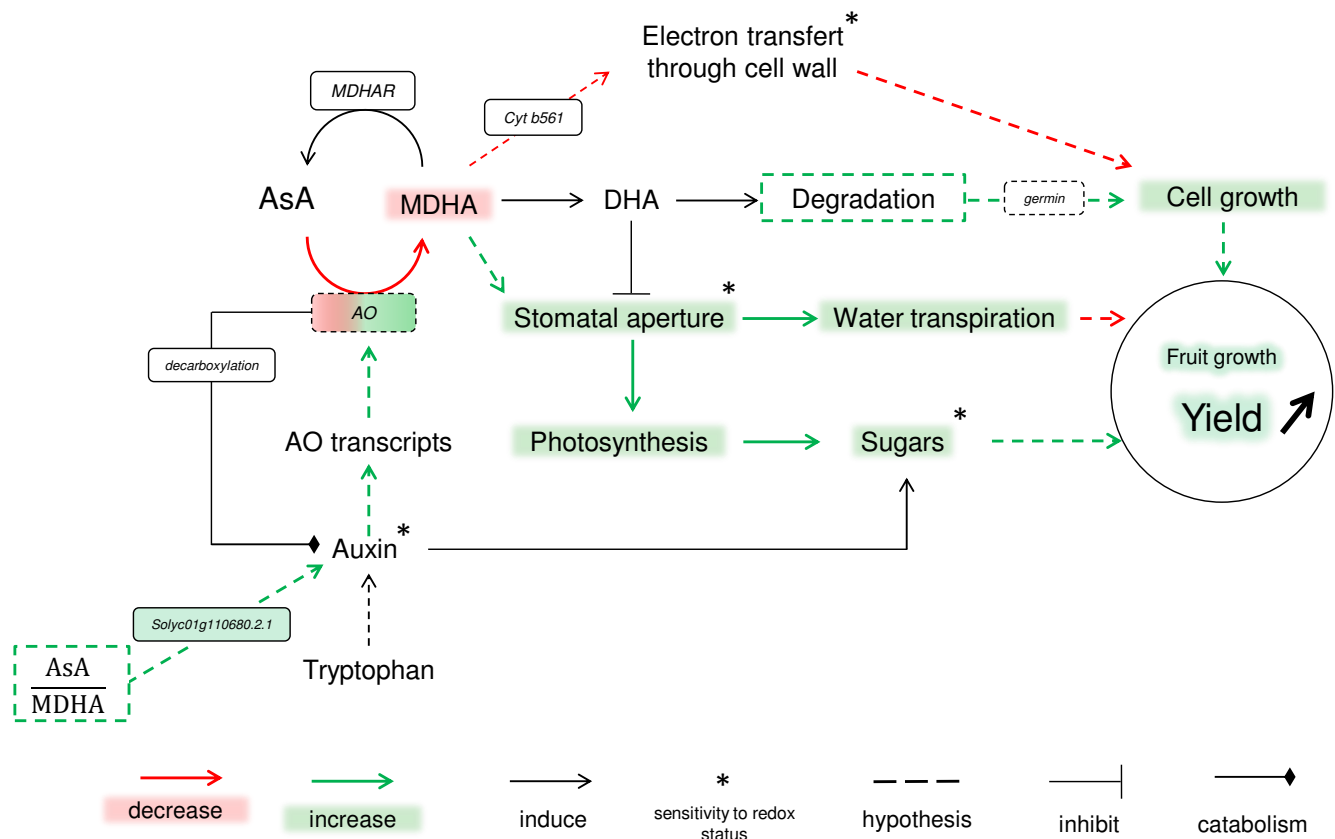


Figure 18 : Hypothetical diagram proposed for AO under-expressing lines and MDHAR silenced lines which could explain the phenotypes described.

L'ascorbate peut également être un précurseur de réactions pro-oxydantes dans l'apoplasme (Fry, 1998), à travers la réaction catalysée par l'oxalate oxydase (autrefois appelé « germin ») aboutissant à la libération d'H₂O₂, potentiellement capable de provoquer des scissions non enzymatiques des polysaccharides présents dans les parois, ainsi d'augmenter l'élasticité des parois (prévenant la lignification) et donc l'expansion cellulaire (Burbridge et al., 2014). Le substrat de cette réaction, l'oxalate, est un produit de dégradation identifié chez la tomate dans le **chapitre 3**. Nous avons également observé que l'accumulation des produits de dégradation pouvait être partiellement sous le contrôle de l'activité de l'enzyme MDHAR : les lignées sous exprimant MDHAR accumulaient moins d'oxalate (et de thréonate) que les lignées témoin, ce que nous avons confirmé à la fois sur de jeunes feuilles en croissance et dans les fruits. L'hypothèse qu'une dégradation plus faible aboutirait à une croissance cellulaire ralentie pourrait être testée par une analyse du taux de dégradation dans les lignées sous exprimant AO. Nous résumons ces hypothèses dans le cadre d'un modèle présenté en **figure 18**.

Par ailleurs, des études approfondies de la dégradation de l'ascorbate peuvent également nous renseigner sur les effets surprenants d'une sous-expression du recyclage sur la concentration en ascorbate (Gest et al., 2013a). La teneur en ascorbate est ainsi négativement corrélée avec l'activité de l'enzyme MDHAR. Si la confirmation d'une dégradation plus faible de l'ascorbate chez les lignées précitées est actée, nous aurons une hypothèse crédible sur le mécanisme de régulation de la teneur en ascorbate par l'enzyme MDHAR, agissant sur le taux de dégradation.

Une autre hypothèse concernant l'établissement des phénotypes de croissance implique le métabolisme des sucres. L'analyse fine du métabolome montre principalement des teneurs en sucres différentes en fonction des lignées. En effet, les lignées sous exprimant AO présentent des teneurs en sucres solubles (principalement glucose et saccharose) plus élevées que le témoin, tandis que les lignées sous exprimant MDHAR présentent des teneurs plus faibles en conditions de forte intensité lumineuse. Cette diminution aurait pu être expliquée par les différences de photosynthèse observée entre les lignées sous-exprimant MDHAR et les lignées témoins : l'activité photosynthétique est légèrement plus faible dans les plantules sous exprimant MDHAR soumises à une forte intensité lumineuse. Cette différence d'activité n'est cependant pas notée à faible intensité lumineuse, ni sur des feuilles matures de plantes âgées de 45 jours. Par ailleurs, les lignées sous-exprimant AO ne montrent pas de changements en termes d'activité photosynthétique avec le témoin. La photosynthèse (et le métabolisme des sucres) n'est donc pas responsable du phénotype observé sous faible intensité lumineuse. Nous avons suggéré que la conductance stomatique, dont la régulation par le statut redox de l'ascorbate est avérée

(Chen et Gallie, 2004), jouerait un rôle dans l'établissement des phénotypes croissance en limitant les échanges gazeux, mais également les mouvements d'eau dans la plante. La molécule DHA induirait la fermeture stomatique (Shi et al., 2012). L'impact du radical MDHA sur la fermeture stomatique n'est pas renseigné, ainsi des analyses complémentaires sur la transpiration des plantes pourraient nous informer de son potentiel rôle : des plantules sous-exprimant MDHAR, placées sous ombrières ou non, pourraient être pesées au cours de la journée pour un suivi fin de la dynamique des pertes d'eau par transpiration et le comparer avec le comportement du témoin. Ainsi, l'intégration de ces données dans un modèle nous permettrait de tester les hypothèses d'une modification du statut redox du pool d'ascorbate sur les mécanismes d'expansion cellulaire et de plasticité des parois.

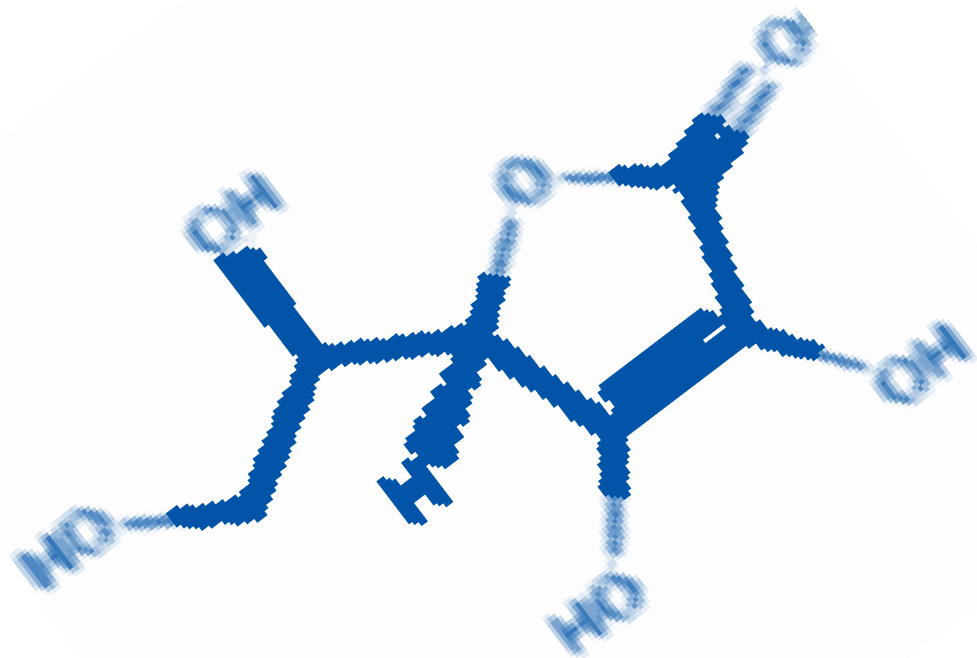
Par ailleurs, une teneur plus faible en saccharose est également observée aux stades précoces de la maturation du fruit, lorsque la croissance cellulaire est la plus forte (entre la nouaison et le stade vert mature). Alors que l'activité photosynthétique ne serait pas impliquée (pas de différence entre nos lignées) et outre le rôle hormonal précédemment décrit, le transport du saccharose depuis les organes sources vers les organes puits pourrait être responsable de cette diminution de la teneur en sucres dans le fruit. Lors de cette thèse, nous avons tenté d'analyser la composition du phloème afin de valider cette hypothèse, mais les expérimentations n'ont pas abouti. Aussi, nous avons tenté de manière indirecte d'étudier la quantité de sucres déchargée du phloème dans le fruit en séparant des fruits de leur bouquet pendant 72h, et en comparant leur profil de sucres avec des fruits attachés à la plante. De nouveau, les essais n'ont pas été concluants. Il est tout à fait possible que le transport ne soit pas affecté, mais de nouvelles d'analyses devront être réalisées avant de conclure définitivement sur le rôle du transport des sucres dans l'établissement des phénotypes « taille du fruit » observés chez les lignées sous-exprimant AO ou MDHAR.

La compréhension de ce contrôle de la croissance cellulaire par AO et/ou MDHAR revêt une importance particulière : (i) tout d'abord puisque MDHAR joue un rôle clé dans la tolérance aux variations brusques de l'environnement et représente un levier d'amélioration des plantes face aux changements climatiques, (ii) et ensuite parce que ce contrôle de la croissance cellulaire affecte le rendement total de la plante. La demande alimentaire ne va cesser d'augmenter durant les prochaines années, et ce dans un contexte de dérèglement climatique, il paraît alors nécessaire d'améliorer notre connaissance du rôle de MDHAR dans la réponse des plantes aux contraintes climatiques.

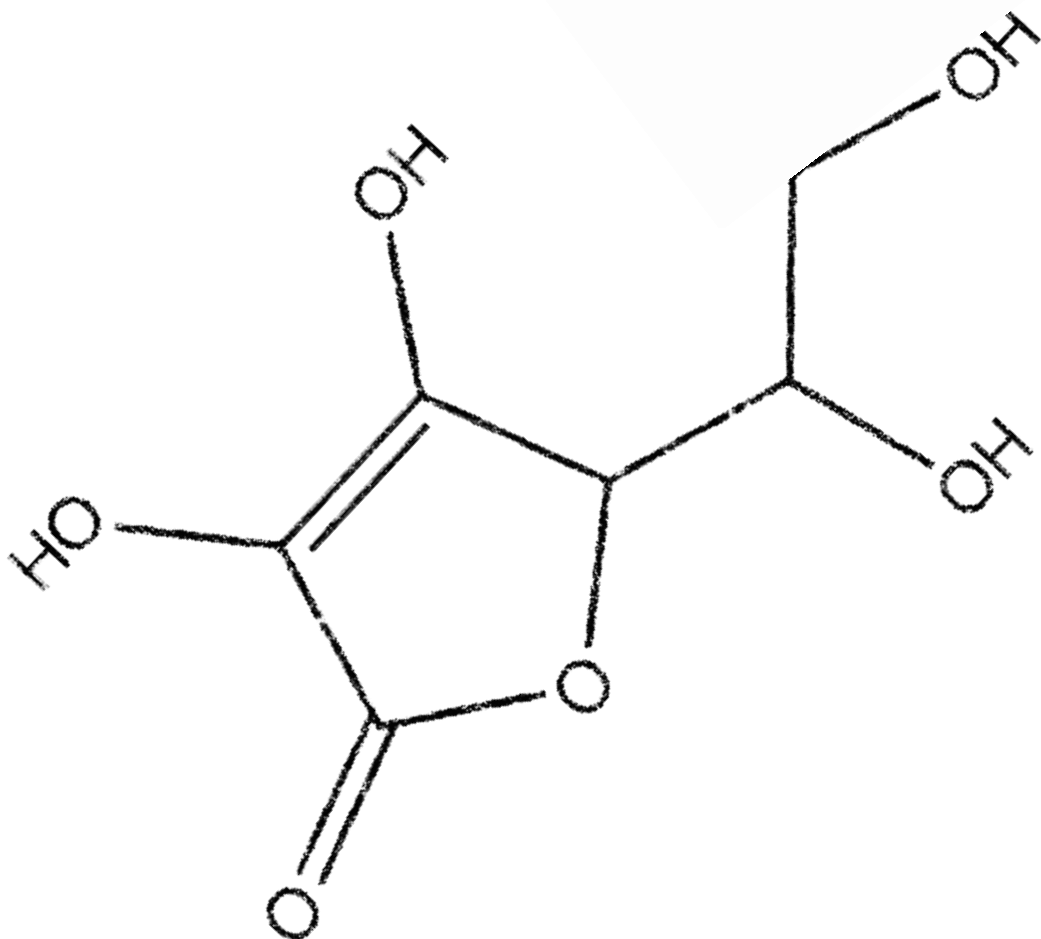
C'est ainsi que dans le **chapitre 2**, nous avons testé l'impact d'une modification de l'activité de MDHAR sur un génotype de tomate cultivé à gros fruit (Moneymaker). En effet, les hypothèses précédemment discutées existent chez la variété WVA106, un génotype de tomate cerise choisi comme modèle d'étude dont le génome pourrait se rapprocher de celui

des espèces sauvages. Nous avons alors mis en avant des liens étroits entre l'expression de MDHAR et le nombre de fruits par bouquet chez Moneymaker. De nouveau, le rendement est affecté, même si les mécanismes impliqués ne sont sans doute pas identiques. La quantité ou le transfert des assimilats des organes sources vers les puits ne sont ici pas impliqués, alors que le nombre de fruits par bouquet augmente en compensation d'une perte du poids du fruit. L'établissement du nombre de fruits sur la plante est le résultat de la floraison puis de la nouaison. La floraison et la nouaison sont régulées par l'auxine et les gibbérellines (De Jong et al., 2009). De nouveau, nous faisons l'hypothèse que le statut redox du couple AsA/MDHA influence la synthèse des hormones (Pastori et al., 2003), et par voie de conséquence, la nouaison. Par ailleurs, des lignées sous-exprimant et sur-exprimant MDHAR chez Micro-Tom sont également étudiées. Outre le fait que le rendement est de nouveau perturbé, la transformation entraînant la surexpression de MDHAR aboutit également à l'apparition de fruit de forme parfaitement arrondie sur ces lignées, à l'inverse de fruits habituellement en forme de cœur (cas des témoins et des lignées sous-exprimant MDHAR). Un tel changement morphologique a déjà été observé chez des mutants Micro-Tom ayant un déficit d'auxine (Sagar et al., 2013; Su et al., 2014). Enfin, nous avons étudié l'effet d'une diminution de l'activité MDHAR uniquement dans le fruit, et non dans les feuilles. Le rendement n'est pas affecté par une diminution de l'activité dans le fruit (alors qu'il l'était par une sous-expression dans la feuille). La biosynthèse de l'auxine a été pour le moment détectée dans les parties végétatives et les racines, mais jamais dans le fruit. Ces informations sont en accord avec les hypothèses que nous proposons et les complètent, à savoir que le statut redox du couple AsA/MDHA de la feuille influence la biosynthèse, l'activation de l'auxine ou son transport dans les organes puits.

Au travers de l'ensemble de ces résultats, nous proposons le manifeste suivant : le statut redox du couple ascorbate / monodéhydroascorbate joue un rôle clé dans les processus de croissance cellulaire et entre dans la régulation du rendement chez la tomate, à travers de multiples liens avec le métabolisme des sucres, le métabolisme des hormones et la dégradation de l'ascorbate. Ces travaux seront poursuivis au sein du laboratoire.



Bibliographie



- Agius F., González-Lamothe R., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Botella M.A., Valpuesta V.** (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**:177–181.
- Airaj H. El, Gest N., Truffault V., Garchery C., Riqueau G., Gouble B., Page D., Stevens R.** (2013) Decreased monodehydroascorbate reductase activity reduces tolerance to cold storage in tomato and affects fruit antioxidant levels. *Postharvest Biology and Technology* **86**:502–510.
- Anjum N.A., Gill S.S., Gill R., Hasanuzzaman M., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I., Tuteja R., Tuteja N.** (2014) Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma* **251**:1265–1283.
- Arrigoni O., De Tullio M.C.** (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1569**:1–9.
- Asard H., Barbaro R., Trost P., Bérczi A.** (2013) Cytochromes b561: ascorbate-mediated trans-membrane electron transport. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**:1026–1035.
- Atkinson C.J., Davies M.J., Taylor J.M., Longbottom H.** (2013) Linking ascorbic acid production in *Ribes nigrum* with fruit development and changes in sources and sinks. *Annals of Botany* **111**:703–712.
- Attolico A.D., De Tullio M.C.** (2006) Increased ascorbate content delays flowering in long-day grown *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant physiology and biochemistry* **44**:462–466.
- Azzi, L., Deluche, C., Gévaudant, F., Frangne, N., Delmas, F., Hernould, M., Chevalier, C.** (2015) Fruit growth-related genes in tomato. *Journal of Experimental Botany* **66**:1075–1086.
- Badejo A.A., Wada K., Gao Y., Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T.** (2012) Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal of Experimental Botany* **63**:229–239.
- Bánhegyi G., Benedetti A., Margittai É., Marcolongo P., Fulceri R., Németh C.E., Szarka A.** (2014) Subcellular compartmentation of ascorbate and its variation in disease states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**:1909–1916.
- Barth C., Moeder W., Klessig D.F., Conklin P.L.** (2004) The Timing of Senescence and Response to Pathogens Is Altered in the Ascorbate-Deficient *Arabidopsis* Mutant vitamin c-1. *Plant Physiology* **134**:1784–1792.

- Barth C., Tullio M.D., Conklin P.L.** (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**:1657–1665.
- Bartoli C.G., Pastori G.M., Foyer C.H.** (2000) Ascorbate Biosynthesis in Mitochondria Is Linked to the Electron Transport Chain between Complexes III and IV. *Plant Physiology* **123**:335–344.
- Bartoli C.G., Yu J., Gómez F., Fernández L., McIntosh L., Foyer C.H.** (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**:1621–1631.
- Bashandy, T., Meyer, Y., Reichheld, J.-P.** (2011) Redox regulation of auxin signaling and plant development in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **6**:117–119.
- Bauchet G., Munos S., Sauvage C., Bonnet J., Grivet L., Causse M.** (2014) Genes involved in floral meristem in tomato exhibit drastically reduced genetic diversity and signature of selection. *BMC Plant Biology* **14**:279.
- Bergougnoux V.** (2014) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**:170–189.
- Bhowmik D., Kumar K.S., Paswan S., Srivastava S.** (2012) Tomato-a natural medicine and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **1**:33–43.
- Blanca J., Montero-Pau J., Sauvage C., Bauchet G., Illa E., Díez M.J., Francis D., Causse M., van der Knaap E., Cañizares J.** (2015) Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* **16**:257.
- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A.** (1993) Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biology and Medicine* **14**(1):49-55.
- Bulley S.M., Rassam M., Hoser D., Otto W., Schünemann N., Wright M., MacRae E., Gleave A., Laing W.** (2009) Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **60**:765–778.
- Bulley S., Wright M., Rommens C., Yan H., Rassam M., Lin-Wang K., Andre C., Brewster D., Karunairetnam S., Allan A.C., Laing W.A.** (2012) Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the l-galactose pathway gene GDP-l-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnology Journal* **10**:390–397.
- Burbridge E., Rasmussen S.K., Bernier F., Kristensen B.K., McCabe P.F., Dix P.J.** (2014) Altered Activity of Peroxidase and Oxalate Oxidase Influences Lignification in Transgenic Tobacco. *The Open Plant Science Journal* **8**:1–8.

- Burkey K.O., Eason G., Fiscus E.L.** (2003) Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content and redox status. *Physiologia Plantarum* **117**:51–57.
- Cai X., Ye J., Hu T., Zhang Y., Ye Z., Li H.** (2014) Genome-wide classification and expression analysis of nucleobase–ascorbate transporter (NAT) gene family in tomato. *Plant Growth Regulation* **73**:19–30.
- Chai L., Wang J.M., Fan Z.-Y., Liu Z.-B., Wen G.-Q., Li X.-F., Yang Y.** (2014) Regulation of the flowering time of *Arabidopsis thaliana* by thylakoid ascorbate peroxidase. *African Journal of Biotechnology* **11**:7151–7157.
- Chao M.-W., Erkekoglu P., Tseng C.-Y., Ye W., Trudel L.J., Skipper P.L., Tannenbaum S.R., Wogan G.N.** (2015) Protective effects of ascorbic acid against the genetic and epigenetic alterations induced by 3,5-dimethylaminophenol in AA8 cells. *Journal of Applied Toxicology* **35**:466–477.
- Chen Z., Young T.E., Ling J., Chang S.-C., Gallie D.R.** (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:3525–3530.
- Cong B., Tanksley S.D.** (2006) FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Molecular Biology* **62**:867–880.
- Conklin P.L.** (2001) Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell & Environment* **24**:383–394.
- Conklin P.L., Barth C.** (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell & Environment* **27**:959–970.
- Conklin P.L., Pallanca J.E., Last R.L., Smirnoff N.** (1997) L-Ascorbic Acid Metabolism in the Ascorbate-Deficient *Arabidopsis* Mutant *vtc1*. *Plant Physiology* **115**:1277–1285.
- Conklin P.L., Saracco S.A., Norris S.R., Last R.L.** (2000) Identification of Ascorbic Acid-Deficient *Arabidopsis thaliana* Mutants. *Genetics* **154**:847–856.
- Consortium T.T.G.** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**:635–641.
- Córdoba F., González-Reyes J.A.** (1994) Ascorbate and plant cell growth. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**:399–405.

- Córdoba-Pedregosa M.C., Córdoba F., Villalba J.M., González-Reyes J.A.** (2003) Zonal Changes in Ascorbate and Hydrogen Peroxide Contents, Peroxidase, and Ascorbate-Related Enzyme Activities in Onion Roots. *Plant Physiology* **131**:697–706.
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., Delledonne, M., Lamattina, L.** (2013) Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **64**:3339–3349.
- Cronje C., George G.M., Fernie A.R., Bekker J., Kossmann J., Bauer R.** (2012) Manipulation of l-ascorbic acid biosynthesis pathways in *Solanum lycopersicum*: elevated GDP-mannose pyrophosphorylase activity enhances l-ascorbate levels in red fruit. *Planta* **235**:553–564.
- Cruz-Rus E., Amaya I., Sánchez-Sevilla J.F., Botella M.A., Valpuesta V.** (2011) Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* **62**:4191–4201.
- Davies J.N., Hobson G.E., McGlasson W.B.** (1981) The constituents of tomato fruit — the influence of environment, nutrition, and genotype. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **15**:205–280.
- DeBolt S., Hardie J., Tyerman S., Ford C.M.** (2004) Composition and synthesis of raphide crystals and druse crystals in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon: Ascorbic acid as precursor for both oxalic and tartaric acids as revealed by radiolabelling studies. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **10**:134–142.
- DeBolt S., Cook D.R., Ford C.M.** (2006) l-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:5608–5613.
- De Jong M., Mariani C., Vriezen W.H.** (2009) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany* **60**:1523–1532.
- De Tullio, M.C., Ciraci, S., Liso, R., Arrigoni, O.** (2007) Ascorbic acid oxidase is dynamically regulated by light and oxygen. A tool for oxygen management in plants? *Journal of Plant Physiology* **164**:39–46.
- De Tullio, M.C., Guether, M., Balestrini, R.** (2013) Ascorbate oxidase is the potential conductor of a symphony of signaling pathways. *Plant Signaling & Behavior* **8**(3):e23213.
- Dietz P.D.K.-J.** (1997) Functions and Responses of the Leaf Apoplast Under Stress. *Progress in Botany*. Springer Berlin Heidelberg **58**:221–254.

- Diplock A.T.** (1998) The Safety of High Doses of Vitamin C. *Vitamin C*. Springer Milan, 125–133.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnoff N.** (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-I-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* **52**:673–689.
- Eltayeb A.E., Kawano N., Badawi G.H., Kaminaka H., Sanekata T., Shibahara T., Inanaga S., Tanaka K.** (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* **225**:1255–1264.
- Eltelib H.A., Badejo A.A., Fujikawa Y., Esaka M.** (2011) Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology* **168**:619–627.
- Endres S., Tenhaken R.** (2009) Myoinositol Oxygenase Controls the Level of Myoinositol in *Arabidopsis*, But Does Not Increase Ascorbic Acid. *Plant Physiology* **149**:1042–1049.
- Esaka M., Fujisawa K., Goto M., Kisu Y.** (1992) Regulation of Ascorbate Oxidase Expression in Pumpkin by Auxin and Copper. *Plant Physiology* **100**:231–237.
- Eskling M., Arvidsson P.-O., Åkerlund H.-E.** (1997) The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* **100**:806–816.
- Esteban M.A., Pei D.** (2012) Vitamin C improves the quality of somatic cell reprogramming. *Nature Genetics* **44**:366–367.
- Foyer C.H., Lelandais M.** (1996) A Comparison of the Relative Rates of Transport of Ascorbate and Glucose Across the Thylakoid, Chloroplast and Plasmalemma Membranes of Pea Leaf Mesophyll Cells. *Journal of Plant Physiology* **148**:391–398.
- Foyer, C.H., Kerchev, P.I., Hancock, R.D.** (2012) The ABA-INSENSITIVE-4 (ABI4) transcription factor links redox, hormone and sugar signaling pathways. *Plant Signaling & Behavior* **7**:276–281.
- Franceschi V.R., Nakata P.A.** (2005) CALCIUM OXALATE IN PLANTS: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* **56**:41–71.
- Franceschi V.R., Tarlyn N.M.** (2002) L-Ascorbic Acid Is Accumulated in Source Leaf Phloem and Transported to Sink Tissues in Plants. *Plant Physiology* **130**:649–656.

Frei B., Birlouez-Aragon I., Lykkesfeldt J. (2012) Authors' Perspective: What is the Optimum Intake of Vitamin C in Humans? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **52**:815–829.

Fry S.C. (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal* **332**(Pt 2):507–515.

Gallie D.R. (2013a) L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. *Scientifica* **2013**:1–24.

Gallie D.R. (2013b) The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany* **64**:433–443.

Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M. (2010) The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum* **138**:430–439.

Gao Y., Badejo A.A., Shibata H., Sawa Y., Maruta T., Shigeoka S., Page M., Smirnoff N., Ishikawa T. (2011) Expression analysis of the VTC2 and VTC5 genes encoding GDP-L-galactose phosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **75**:1783–1788.

Garchery C., Gest N., Do P.T., Alhagdow M., Baldet P., Menard G., Rothan C., Massot C., Gautier H., Aarrouf J., Fernie A.R., Stevens R. (2013) A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. *Plant, Cell & Environment* **36**:159–175.

Gautier H., Diakou-Verdin V., Bénard C., Reich M., Buret M., Bourgaud F., Poëssel J.L., Caris-Veyrat C., Génard M. (2008) How Does Tomato Quality (Sugar, Acid, and Nutritional Quality) Vary with Ripening Stage, Temperature, and Irradiance? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:1241–1250.

Gautier H., Massot C., Stevens R., Sérino S., Génard M. (2009) Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance. *Annals of Botany* **103**:495–504.

Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T., Kononowicz A.K. (2014) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **120**:881–902.

Gest N., Garchery C., Gautier H., Jiménez A., Stevens R. (2013a) Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnology Journal* **11**:344–354.

- Gest N., Gautier H., Stevens R.** (2013b) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany* **64**:33–53.
- Gest N., Page D., Birtic S., Gouble B., Gilbert L., Garchery C., Causse M., Stevens R.** (2010) Response of the fruit antioxidant system to the post-chilling period in two different tomato lines. *Functional Plant Science and Biotechnology* **4**:76–83.
- Gibon Y., Blaesing O.E., Hannemann J., Carillo P., Höhne M., Hendriks J.H.M.,..., Stitt M.** (2004) A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in Arabidopsis Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell* **16**:3304–3325.
- Gilbert L., Alhagdow M., Nunes-Nesi A., Quemener B., Guillon F., Bouchet B., Faurobert M., Gouble B., Page D., Garcia V., Petit J., Stevens R., Causse M., Fernie A.R., Lahaye M., Rothan C., Baldet P.** (2009) GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *The Plant Journal* **60**:499–508.
- Goh S.-Y., Cooper M.E.** (2008) The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **93**:1143–1152.
- Gomez L., Rubio E., Augé M.** (2002) A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**:360–369.
- Gonzalez-Reyes J., Alcain F., Caler J., Serrano A., Cordoba F., Navas P.** (1995) Stimulation of Onion Root Elongation by Ascorbate and Ascorbate Free-Radical in *Allium-Cepa* L. *Protoplasma* **184**:31–35.
- Gould K.S., Markham K.R., Smith R.H., Goris J.J.** (2000) Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. *Journal of Experimental Botany* **51**:1107–1115.
- Gournas C., Papageorgiou I., Diallinas G.** (2008) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Molecular bioSystems* **4**:404–416.
- Green M.A., Fry S.C.** (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**:83–87.
- Griffith, O. W.** (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry* **106**(1):207-212.

Hamner K.C., Bernstein L., Maynard L.A. (1945) Effects of Light Intensity, Day Length, Temperature, and Other Environmental Factors on the Ascorbic Acid Content of Tomatoes. *The Journal of Nutrition* **29**:85–97.

Hancock R., McRae D., Haupt S., Viola R. (2003) Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC plant biology* **3**:7.

Hancock R.D., Viola R. (2005) Biosynthesis and Catabolism of L-Ascorbic Acid in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**:167–188.

Hancock R.D., Walker P.G., Pont S.D.A., Marquis N., Vivera S., Gordon S.L., Brennan R.M., Viola R. (2007) L-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by in situ biosynthesis via the L-galactose pathway. *Functional Plant Biology* **34**:1080–1091.

Haroldsen V.M., Chi-Ham C.L., Kulkarni S., Lorence A., Bennett A.B. (2011) Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**:1244–1249.

Helsper J.P., Loewus F.A. (1982) Metabolism of L-Threonic Acid in *Rumex x acutus* L. and *Pelargonium crispum* (L.) L'Hér. *Plant Physiology* **69**:1365–1368.

Horemans N., Asard H., Caubergs R.J. (1994) The Role of Ascorbate Free Radical as an Electron Acceptor to Cytochrome b-Mediated Trans-Plasma Membrane Electron Transport in Higher Plants. *Plant Physiology* **104**:1455–1458.

Horemans N., Asard H., Caubergs R.J. (1997) The Ascorbate Carrier of Higher Plant Plasma Membranes Preferentially Translocates the Fully Oxidized (Dehydroascorbate) Molecule. *Plant Physiology* **114**:1247–1253.

Horemans N., Foyer C.H., Asard H. (2000a) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* **5**:263–267.

Horemans N., Foyer C., Potters G., Asard H. (2000b) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**:531–540.

Huang M., Xu Q., Deng X.-X. (2014) L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Journal of Plant Physiology* **171**:1205–1216.

Ioannidi E., Kalamaki M.S., Engineer C., Pateraki I., Alexandrou D., Mellidou I., Giovannonni J., Kanellis A.K. (2009) Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **60**:663–678.

- Kato N., Esaka M.** (1999) Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia Plantarum* **105**:321–329.
- Kato N., Esaka M.** (2000) Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. *Planta* **210**:1018–1022.
- Kay P., Wagner J.R., Gagnon H., Day R., Klarskov K.** (2013) Modification of peptide and protein cysteine thiol groups by conjugation with a degradation product of ascorbate. *Chemical Research in Toxicology* **26**:1333–1339.
- Kerchev P.I., Pellny T.K., Vivancos P.D., Kiddle G., Hedden P., Driscoll S., Vanacker H., Verrier P., Hancock R.D., Foyer C.H.** (2011) The Transcription Factor ABI4 Is Required for the Ascorbic Acid–Dependent Regulation of Growth and Regulation of Jasmonate-Dependent Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**:3319–3334.
- Kerk N.M., Jiang K., Feldman L.J.** (2000) Auxin Metabolism in the Root Apical Meristem. *Plant Physiology* **122**:925–932.
- Khan S.R.** (1995) Calcium Oxalate in Biological Systems. *CRC Press*.
- Korasick, D.A., Enders, T.A., Strader, L.C.** (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* **64**:2541–2555.
- Kostman T.A., Tarlyn N.M., Loewus F.A., Franceschi V.R.** (2001) Biosynthesis of L-Ascorbic Acid and Conversion of Carbons 1 and 2 of L-Ascorbic Acid to Oxalic Acid Occurs within Individual Calcium Oxalate Crystal Idioblasts. *Plant Physiology* **125**:634–640.
- Kotchoni S.O., Larrimore K.E., Mukherjee M., Kempinski C.F., Barth C.** (2009) Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in Arabidopsis. *Plant Physiology* **149**:803–815.
- Lachapelle M.Y., Drouin G.** (2010) Inactivation dates of the human and guinea pig vitamin C genes. *Genetica* **139**:199–207.
- Laing W.A., Martínez-Sánchez M., Wright M.A., Bulley S.M., Brewster D., Dare A.P., Rassam M., Wang D., Storey R., Macknight R.C., Hellens R.P.** (2015) An Upstream Open Reading Frame Is Essential for Feedback Regulation of Ascorbate Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **27**:772–786.
- Lane B.G.** (1994) Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *The FASEB Journal* **8**:294–301.
- Libert B., Franceschi V.R.** (1987) Oxalate in crop plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**:926–938.

- Li J., Liang D., Li M., Ma F.** (2013) Light and abiotic stresses regulate the expression of GDP-I-galactose phosphorylase and levels of ascorbic acid in two kiwifruit genotypes via light-responsive and stress-inducible cis-elements in their promoters. *Planta* **238**:535–547.
- Li M., Ma F., Liu J., Li J.** (2010) Shading the whole vines during young fruit development decreases ascorbate accumulation in kiwi. *Physiologia Plantarum* **140**:225–237.
- Li M., Ma F., Shang P., Zhang M., Hou C., Liang D.** (2009) Influence of light on ascorbate formation and metabolism in apple fruits. *Planta* **230**:39–51.
- Linster C.L., Gomez T.A., Christensen K.C., Adler L.N., Young B.D., Brenner C., Clarke S.G.** (2007) Arabidopsis VTC2 Encodes a GDP-I-Galactose Phosphorylase, the Last Unknown Enzyme in the Smirnoff-Wheeler Pathway to Ascorbic Acid in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **282**:18879–18885.
- Linster C.L., Van Schaftingen E.** (2007) Vitamin C. *FEBS Journal* **274**:1–22.
- Liptay A., Papadopoulos A.P., Bryan H.H., Gull D.** (1986) Ascorbic acid levels in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) at low temperatures. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**(12):3185–3187.
- Lisenbee C.S., Lingard M.J., Trelease R.N.** (2005) Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *The Plant Journal* **43**:900–914.
- Liso R., Calabrese G., Bitonti M.B., Arrigoni O.** (1984) Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental Cell Research* **150**:314–320.
- Loewus F.A.** (1963) Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry* **2**:109–128.
- Loewus F.A., Loewus M.W., Seib P.A.** (1987) Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **5**:101–119.
- Lokhande S.D., Ogawa K., Tanaka A., Hara T.** (2003) Effect of temperature on ascorbate peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotypes under different light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**:57–64.
- Lorence A., Chevone B.I., Mendes P., Nessler C.L.** (2004) myo-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. *Plant Physiology* **134**:1200–1205.
- Massot C., Bancel D., Lopez Lauri F., Truffault V., Baldet P., Stevens R., Gautier H.** (2013) High Temperature Inhibits Ascorbate Recycling and Light Stimulation of the Ascorbate Pool in Tomato despite Increased Expression of Biosynthesis Genes. *PLoS ONE* **8**:e84474.

- Massot C., Génard M., Stevens R., Gautier H.** (2010) Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**:751–757.
- Massot C., Stevens R., Génard M., Longuenesse J.-J., Gautier H.** (2012) Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta* **235**:153–163.
- Masuda Y.** (1990) Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. *The botanical magazine* **103**:345–370.
- Maurino V.G., Grube E., Zielinski J., Schild A., Fischer K., Flügge U.-I.** (2006) Identification and Expression Analysis of Twelve Members of the Nucleobase–Ascorbate Transporter (NAT) Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**:1381–1393.
- McCollum J.** (1946) Effect of sunlight exposure on the quality constituents of tomato fruits. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* **48**:413–416.
- McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R.** (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* **5**:81–84.
- Melino V., Soole K., Ford C.** (2009) Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC plant biology* **9**:145.
- Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S.** (2004) Feedback Inhibition of Spinach L-Galactose Dehydrogenase by L-Ascorbate. *Plant and Cell Physiology* **45**:1271–1279.
- Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**:405–410.
- Miyaji T., Kuromori T., Takeuchi Y., Yamaji N., Yokosho K., Shimazawa A., Sugimoto E., Omote H., Ma J.F., Shinozaki K., Moriyama Y.** (2015) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **6**.
- Moss R.W.** (1988) Free radical: Albert Szent-Gyorgyi and the battle over vitamin C. *The Journal of Nutrition* **118**(11):1422–1423.
- Müller-Moulé P.** (2008) An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. *Plant Molecular Biology* **68**:31–41.

- Murray J.R., Hackett W.P.** (1991) Dihydroflavonol Reductase Activity in Relation to Differential Anthocyanin Accumulation in Juvenile and Mature Phase *Hedera helix* L. *Plant Physiology* **97**:343–351.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., & Sallanon, H.** (2008) Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. *Analytical biochemistry* **383**(2):320–322.
- Nakata P.A.** (2003) Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* **164**:901–909.
- Nakata P.A.** (2012) Plant calcium oxalate crystal formation, function, and its impact on human health. *Frontiers in Biology* **7**:254–266.
- Nakata P.A., McConn M.M.** (2003a) Influence of the calcium oxalate defective 4 (cod4) mutation on the growth, oxalate content, and calcium content of *Medicago truncatula*. *Plant Science* **164**:617–621.
- Nakata P.A., McConn M.M.** (2003b) Calcium oxalate crystal formation is not essential for growth of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**:325–329.
- Nakata P.A., McConn M.** (2007) Isolated *Medicago truncatula* mutants with increased calcium oxalate crystal accumulation have decreased ascorbic acid levels. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**:216–220.
- Nemet I., Monnier V.M.** (2011) Vitamin C Degradation Products and Pathways in the Human Lens. *Journal of Biological Chemistry* **286**:37128–37136.
- Nishikimi M., Fukuyama R., Minoshima S., Shimizu N., Yagi K.** (1994) Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry* **269**:13685–13688.
- Nishikimi M., Kawai T., Yagi K.** (1992) Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species. *Journal of Biological Chemistry* **267**:21967–21972.
- Noctor G., Foyer C.** (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **49**:249–279.
- Obara K., Sumi K., Fukuda H.** (2002) The Use of Multiple Transcription Starts Causes the Dual Targeting of Arabidopsis Putative Monodehydroascorbate Reductase to Both Mitochondria and Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **43**:697–705.

- Page M., Sultana N., Paszkiewicz K., Florance H., Smirnoff N.** (2012) The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell & Environment* **35**:388–404.
- Pallanca J.E., Smirnoff N.** (2000) The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *Journal of Experimental Botany* **51**:669–674.
- Parsons, H. T., Fry, S. C.** (2010) Reactive oxygen species induced release of intracellular ascorbate in plant cell suspension cultures and evidence for pulsing of net release rate. *New Phytologist* **187**(2):332-342.
- Parsons H.T., Fry S.C.** (2012) Oxidation of dehydroascorbic acid and 2,3-diketogulonate under plant apoplastic conditions. *Phytochemistry* **75**:41–49.
- Parsons H.T., Yasmin T., Fry S.C.** (2011) Alternative pathways of dehydroascorbic acid degradation in vitro and in plant cell cultures: novel insights into vitamin C catabolism. *The Biochemical journal* **440**:375–383.
- Pastori G.M., Kiddle G., Antoniow J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H.** (2003) Leaf Vitamin C Contents Modulate Plant Defense Transcripts and Regulate Genes That Control Development through Hormone Signaling. *The Plant Cell Online* **15**:939–951.
- Pavet V., Olmos E., Kiddle G., Mowla S., Kumar S., Antoniow J., Alvarez M.E., Foyer C.H.** (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**:1291–1303.
- Pignocchi C., Foyer C.H.** (2003) Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:379–389.
- Pinto M.C. de, Francis D., Gara L.D.** (1999) The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **209**:90–97.
- Podmore I.D., Griffiths H.R., Herbert K.E., Mistry N., Mistry P., Lunec J.** (1998) Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* **392**:559–559.
- Potters G., Horemans N., Bellone S., Caubergs R.J., Trost P., Guisez Y., Asard H.** (2004) Dehydroascorbate Influences the Plant Cell Cycle through a Glutathione-Independent Reduction Mechanism. *Plant Physiology* **134**:1479–1487.
- Prescott A.G., John P.** (1996) DIOXYGENASES: Molecular Structure and Role in Plant Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**:245–271.

Qin A., Shi Q., Yu X. (2011) Ascorbic acid contents in transgenic potato plants overexpressing two dehydroascorbate reductase genes. *Molecular Biology Reports* **38**:1557–1566.

Regulus P., Desilets J.-F., Klarskov K., Wagner J.R. (2010) Characterization and detection in cells of a novel adduct derived from the conjugation of glutathione and dehydroascorbate. *Free Radical Biology and Medicine* **49**:984–991.

Ren J., Duan W., Chen Z., Zhang S., Song X., Liu T., Hou X., Li Y. (2014) Overexpression of the Monodehydroascorbate Reductase Gene from Non-heading Chinese Cabbage Reduces Ascorbate Level and Growth in Transgenic Tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter*:1–12.

Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The Plant Journal* **23**(1):131–142.

Sadowska-Bartosz, I., Bartosz, G. (2015) Ascorbic acid and protein glycation in vitro. *Chemico-Biological Interactions* (Available online).

Sagar, M., Chervin, C., Mila, I., Hao, Y., Roustan, J.-P., Benichou, M., Gibon, Y., Biais, B., Maury, P., Latché, A., Pech, J.-C., Bouzayen, M., Zouine, M. (2013) SIARF4, an Auxin Response Factor Involved in the Control of Sugar Metabolism during Tomato Fruit Development. *Plant Physiology* **161**:1362–1374.

Sanmartin, M., Drogoudi, P. D., Lyons, T., Pateraki, I., Barnes, J., & Kanellis, A. K. (2003). Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**(6):918–928.

Schlueter A.K., Johnston C.S. (2011) Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* **16**:49–57.

Schopfer P., Liskay A., Bechtold M., Frahy G., Wagner A. (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**:821–828.

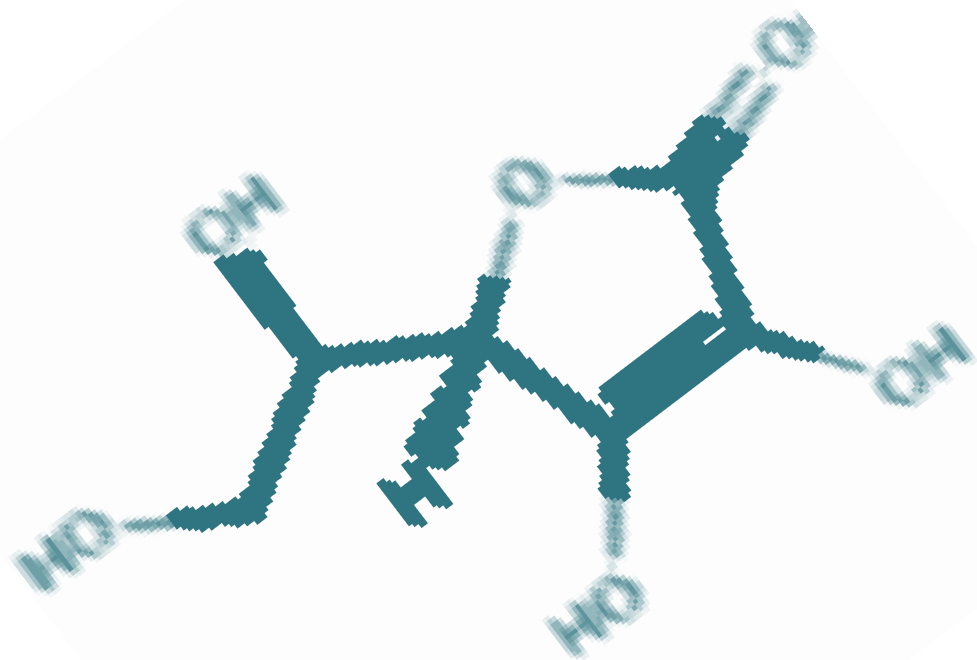
Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* **2012**:1–26.

Shi, Y.C., Fu, Y.P., Liu, W.Q. (2012) NADPH oxidase in plasma membrane is involved in stomatal closure induced by dehydroascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* **51**:26–30.

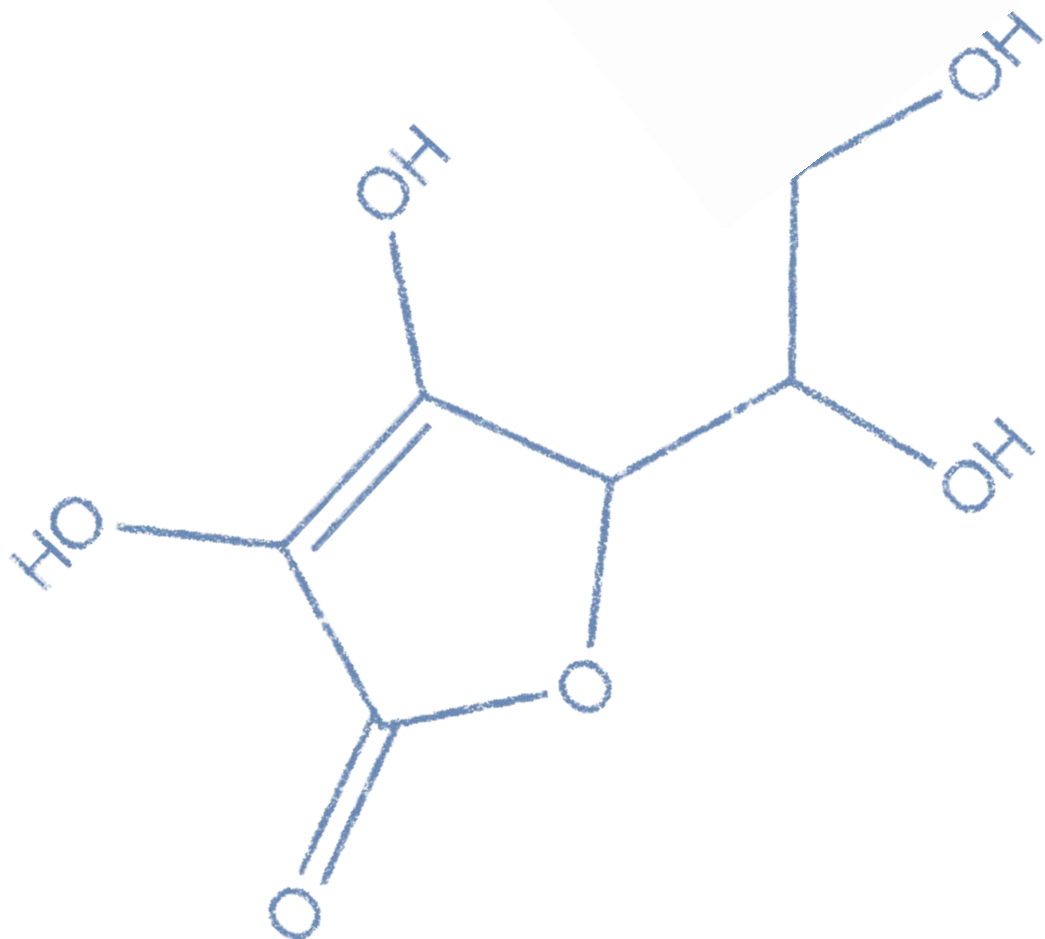
- Simpson G.L., Ortwerth B..** (2000) The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) - Molecular Basis of Disease **1501**:12–24.
- Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L.** (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**:129–146.
- Smirnoff N.** (1996) BOTANICAL BRIEFING: The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany* **78**:661–669.
- Smirnoff N.** (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Biological Sciences* **355**:1455–1464.
- Smirnoff N., Wheeler G.L.** (2000) Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**:291–314.
- Smuda M., Glomb M.A.** (2013) Maillard Degradation Pathways of Vitamin C. *Angewandte Chemie International Edition* **52**:4887–4891.
- Stevens R., Buret M., Duffé P., Garchery C., Baldet P., Rothan C., Causse M.** (2007) Candidate Genes and Quantitative Trait Loci Affecting Fruit Ascorbic Acid Content in Three Tomato Populations. *Plant Physiology* **143**:1943–1953.
- Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zamir D., Causse M.** (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, cell & environment* **31**:1086–1096.
- Su, L., Bassa, C., Audran, C., Mila, I., Cheniclet, C., Chevalier, C., Bouzayen, M., Roustan, J.-P., Chervin, C.** (2014) The Auxin SI-IAA17 Transcriptional Repressor Controls Fruit Size Via the Regulation of Endoreduplication-Related Cell Expansion. *Plant Cell Physiology* **55**:1969–1976.
- Szent-Györgyi A., Haworth N.** (1933) ‘Hexuronic Acid’ (Ascorbic Acid) as the Antiscorbutic Factor. *Nature* **131**:24-24
- Tabata K., Takaoka T., Esaka M.** (2002) Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry* **61**:631–635.
- Tognetti, V.B., Mühlenbock, P., Van Breusegem, F.** (2012) Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant, Cell & Environment* **35**:321–333.
- Tsaniklidis G., Delis C., Nikoloudakis N., Katinakis P., Aivalakis G.** (2014a) Low temperature storage affects the ascorbic acid metabolism of cherry tomato fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* **84**:149–157.

- Tsaniklidis G., Delis C., Nikoloudakis N., Katinakis P., Passam H.C., Aivalakis G.** (2014b) L-Ascorbic acid metabolism in parthenocarpic and seeded cherry tomatoes. *Plant Growth Regulation* **72**:141–153.
- Valluru R., Van den Ende W.** (2011) Myo-inositol and beyond – Emerging networks under stress. *Plant Science* **181**:387–400.
- Valpuesta V., Botella M.A.** (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* **9**:573–577.
- Veljovic-Jovanovic S.D., Pignocchi C., Noctor G., Foyer C.H.** (2001) Low Ascorbic Acid in the vtc-1 Mutant of Arabidopsis Is Associated with Decreased Growth and Intracellular Redistribution of the Antioxidant System. *Plant Physiology* **127**:426–435.
- Vera J.C., Rivas C.I., Fischbarg J., Golde D.W.** (1993) Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* **364**:79–82.
- Viveros M.F.Á., Inostroza-Blancheteau C., Timmermann T., González M., Arce-Johnson P.** (2013) Overexpression of GlyI and GlyII genes in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) plants confers salt tolerance by decreasing oxidative stress. *Molecular Biology Reports* **40**:3281–3290.
- Wang Z., Xiao Y., Chen W., Tang K., Zhang L.** (2010) Increased Vitamin C Content Accompanied by an Enhanced Recycling Pathway Confers Oxidative Stress Tolerance in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**:400–409.
- Wang J., Yu Y., Zhang Z., Quan R., Zhang H., Ma L., Deng X.W., Huang R.** (2013) Arabidopsis CSN5B Interacts with VTC1 and Modulates Ascorbic Acid Synthesis. *The Plant Cell* **25**:625–636.
- Wheeler G.L., Ishikawa T., Pornsaksit V., Smirnoff N.** (2015) Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *eLife* **4**:e06369.
- Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N.** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**:365–369.
- Wolucka B.A., Montagu M.V.** (2003) GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**:47483–47490.
- Xiang L., Li Y., Rolland F., Van den Ende W.** (2011) Neutral invertase, hexokinase and mitochondrial ROS homeostasis: Emerging links between sugar metabolism, sugar signaling and ascorbate synthesis. *Plant Signaling & Behavior* **6**:1567–1573.

- Yang J.C., Loewus F.A.** (1975) Metabolic Conversion of L-Ascorbic Acid to Oxalic Acid in Oxalate-accumulating Plants. *Plant Physiology* **56**:283–285.
- Ye Z., Rodriguez R., Tran A., Hoang H., de los Santos D., Brown S., Vellanoweth R.L.** (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **158**:115–127.
- Yu, L., Jiang, J., Zhang, C., Jiang, L., Ye, N., Lu, Y., Yang, G., Liu, E., Peng, C., He, Z., Peng, X.,** (2010) Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice. *Journal of Experimental Botany* **61**:1625–1634.
- Young J.I., Züchner S., Wang G.** (2015) Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annual Review of Nutrition* **35**:545-564.
- Zanor M.I., Osorio S., Nunes-Nesi A., Carrari F., Lohse M., Usadel B., Kühn C., Bleiss W., Giavalisco P., Willmitzer L., Sulpice R., Zhou Y.-H., Fernie A.R.** (2009) RNA Interference of LIN5 in Tomato Confirms Its Role in Controlling Brix Content, Uncovers the Influence of Sugars on the Levels of Fruit Hormones, and Demonstrates the Importance of Sucrose Cleavage for Normal Fruit Development and Fertility. *Plant Physiology* **150**:1204–1218.
- Zechmann B., Stumpe M., Mauch F.** (2011) Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta* **233**:1–12.



ANNEXES



Sommaire des annexes

ANNEXE 1: **Truffault, V., Gest, N., Garchery, C., Causse, M., Duboscq, R., Riqueau, G., ... & Stevens, R.** (2014). Variation in tomato fruit ascorbate levels and consequences of manipulation of ascorbate metabolism on drought stress tolerance. *Acta horticulturae*.

ANNEXE 2 : Poster présenté au congrès international Plant Oxygen Group (POG) 2013 « Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants » à Varsovie, Pologne. Juillet 2014. Influence of temperature and ascorbate-recycling in tomato fruits on the ascorbate pool and ascorbate degradation products.

ANNEXE 3: Comparaison des expressions de genes dans les lignées WT, AO et MDHAR effectuée dans le cadre du projet Agrobi. L'annexe 3 présente les 21 gènes (sur 241) les plus différemment exprimés entre les lignées AO et MDHAR.

Variation in Tomato Fruit Ascorbate Levels and Consequences of Manipulation of Ascorbate Metabolism on Drought Stress Tolerance

Vincent Truffault^{ab}, Noé Gest^a, Cécile Garchery^a, Pierre Baldet^c, Mathilde Causse^a, Renaud Duboscq^a, Hélène Gautier^b, Gisèle Riquieu^a, Christopher Sauvage^a, Rebecca Stevens^{a*}

^aINRA, UR1052, Génétique et amélioration des fruits et légumes, Domaine St Maurice, 84143 Montfavet, France

^bINRA, UR1115, Plantes et systèmes de culture horticoles, Domaine St Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

^cINRA, UMR1332, Biologie du Fruit et Pathologie, 33883 Villenave d'Ornon, France

Abstract

Tomato is an important crop worldwide and one of the major sources of vitamin C (ascorbate) in the human diet. Ascorbate contributes both to tomato nutritional quality and has roles in stress tolerance and adaptation to the environment. In this study we show the variability that exists in tomato germplasm in terms of ascorbate content (10 to 90 mg/100 gfw) which could be starting point for evaluating correlations with physiological traits potentially linked to ascorbate. We have then manipulated genes involved in ascorbate metabolism, using RNA interference, to investigate their influence on fruit ascorbate levels, fruit physiology and yield under both normal and drought stress conditions. There is some evidence that one of the genes chosen affects fruit size and yield under different conditions, but clear effects on the fruit ascorbate pool are not seen. We conclude that ascorbate metabolism is complex and can also have wider effects on fruit physiology and growth.

Keywords:

water, diversity, adaptation, growth, *Solanum lycopersicum*, vitamin C

INTRODUCTION

Crops showing tolerance and maintenance of yield following prolonged periods of mild or severe stress, particularly drought stress, are necessary for world food production (Morison et al., 2008). Drought stress seriously limits plant and crop productivity worldwide and is one of the major abiotic stresses that represent the primary cause of crop loss worldwide, causing average yield losses of 50% for major crops (Boyer, 1982). In order to develop plants adapted to drier conditions, understanding of the physiological and molecular responses to water limitation is required. The impacts of water limitation on plant physiology are rapid and numerous and include changes in stomatal conductance and decreased growth and photosynthetic levels. The effects of water limitation on photosynthetic efficiency lead to decreases in carbon fixation and therefore ultimately a drop in plant, grain or fruit yield. At a molecular level, drought stress induces signals leading to alterations in gene expression, accumulation of abscisic acid, synthesis of drought-responsive proteins and metabolites, often over the course of several days or months. Ideally, traits should allow the prolonged maintenance of photosynthesis and include other factors that contribute to yield: eg increased mobilisation of carbon supplies from source to sink or improved root architecture (Prudent et al., 2009; Prudent et al., 2010; Muller et al., 2011). Antioxidants, such as ascorbate, can play roles in the processes affecting drought tolerance (Garchery et al., 2013).

Ascorbate (vitamin C) was initially purified by Dr Szent-Gyorgyi from pepper, a fruit rich in ascorbate, in the early 20th century. Dr Szent-Gyorgyi was subsequently awarded a Nobel prize in 1937 due in part to his work on the purification of this molecule. The history of the discovery of ascorbate however dates back to 1747 when Sir James Lind, a Scottish doctor in the British navy, carried out an experiment on sailors at sea in what was a very early example of a controlled trial. Sailors living at sea for long periods fell ill from an incurable illness called scurvy and Lind gave them one of six treatments, one of which was two oranges and a lemon. The fruit gave the best results and the subsequent addition of lemon juice to the diet of sailors rid the Royal Navy of scurvy by the end of the 18th century.

Plants and fruit are major sources of ascorbate, but concentrations of this molecule are highly variable from one species to another and in different tissues, fruit showing a particularly good range of variability. Citrus fruit (*Rutaceae* family) are reputed for being rich in ascorbate, they contain around 50 mg/100g fwt, but fruit such as the camu-camu (*Myrciaria dubia*; an Amazonian berry; 2-3 g/100g fwt) and acerola (*Malpighia emarginata*; 1 g/100g fwt) are so far the richest sources found. In regularly consumed fruit such as tomato (*Solanum lycopersicum*), concentrations are lower: 10-20 mg/gfwt for large-fruited domesticated cultivars (Stevens et al., 2007; Gest et al., 2013b).

As well as being an essential vitamin for the human diet, ascorbate in plants has many cellular functions, mostly linked to the molecule's capacity to donate electrons. The molecule is a cofactor for numerous enzymatic reactions such as for the oxygenases involved in the synthesis of hormones, flavonoids and alkaloids (Prescott and John, 1996). In chloroplasts, ascorbate is necessary for the xanthophyll cycle which allows dissipation of light energy as heat (Demmig-Adams and Adams, 1996).

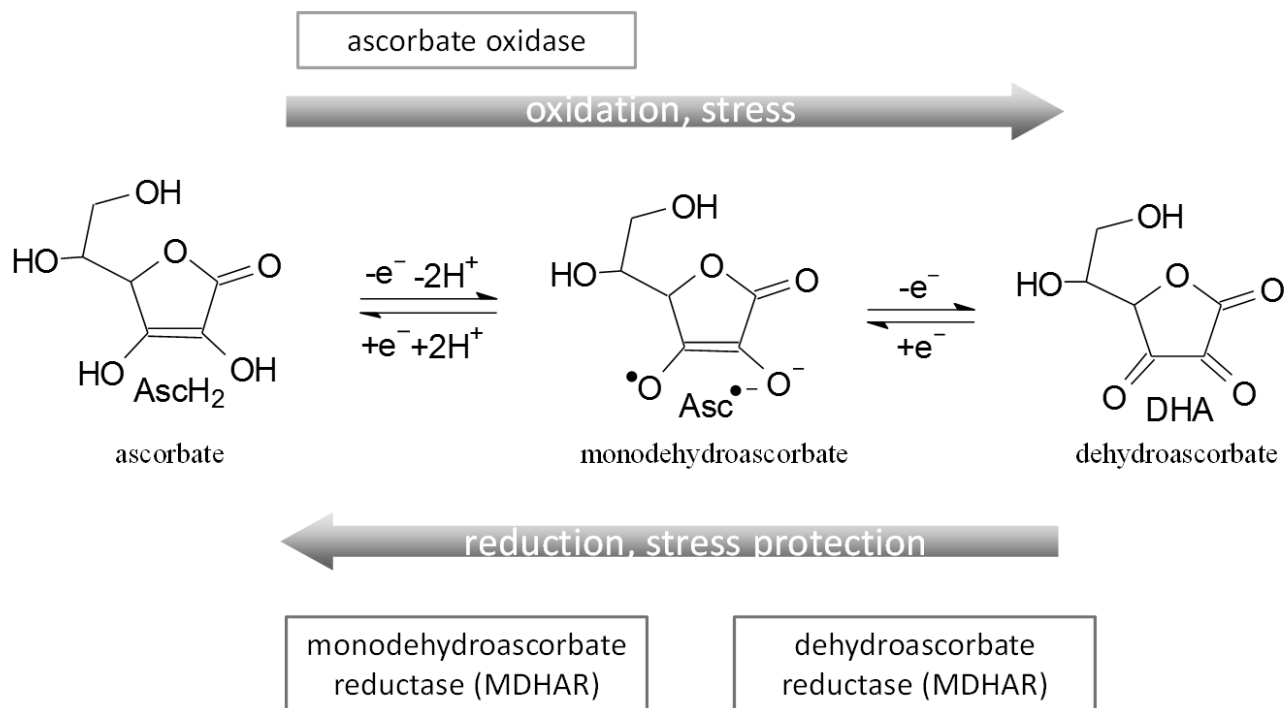


Figure 1

The molecule also has a role in growth and development, including aspects such as flowering time, as study of the *Arabidopsis* low vitamin C (*vtc*) mutants has shown (Pavet et al., 2005; Dowdle et al., 2007). Finally numerous studies have linked ascorbate, or ascorbate recycling, to stress tolerance in different species (Huang et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; Stevens et al., 2008; Garchery et al., 2013).

At physiological pH, ascorbic acid is present in its mono-anionic form, ascorbate, with the chemical formula $C_6H_8O_6$. The molecule is hydrosoluble and the presence of an enediol group gives the molecule its electron donating properties. In losing electrons, the ascorbate molecule becomes oxidized and is found either as a monodehydroascorbate radical (one electron lost) or as the more stable form of dehydroascorbate (DHA; two electrons lost) (Figure 1). The ratio of the oxidized to the reduced forms of ascorbate fluctuates according to environmental conditions or during plant development. As ascorbate is an unstable molecule it is rapidly oxidized to dehydroascorbate, which is also unstable, and is degraded to produce intermediates such as oxalate (Green and Fry, 2005). Ascorbate levels are under both genetic and environmental control and are in particular controlled by light (Gautier et al., 2009). The major genetic control points that are known about in plants are the genes controlling the synthesis and recycling of ascorbate (Figure 2). *GDP L-galactose phosphorylase* appears to exert most of the control of the flux through the synthesis pathway (Bulley et al., 2009) and the expression of this gene is often correlated with ascorbate content (Massot et al., 2012). Reductases such as monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase regenerate ascorbate from mono- or dehydroascorbate and therefore have roles in stress tolerance (Kwon et al., 2003; Eltayeb et al., 2007; Stevens et al., 2008; Gest et al., 2010; Gest et al., 2013a). In this paper we examine ascorbate variability in tomato fruit germplasm and show how the manipulation of two genes involved in ascorbate metabolism can affect fruit physiology under both normal conditions and abiotic stress conditions. The results may give help in directing future research on ascorbate and its functions and also for breeding in tomato.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

In tomato, a core collection maximizing the genetic diversity with a minimum of individuals has been built for different purposes including population genetics, investigation of domestication or association mapping (Ranc et al., 2008). This collection consisted of 360 accessions made up of domesticated cultivars (*S. lycopersicum*), cherry tomato cultivars (*S. l. cerasiforme*) and wild accessions (*S. pimpinelifolium*). A subset of this collection that contained 19, 32 and 148 wild, domesticated and cherry accessions respectively was used in the present study. The *Solanum lycopersicum* L. cultivar West Virginia 106 (WVa106, a cherry tomato) accession was chosen for transformation for study of genes involved in ascorbate metabolism.

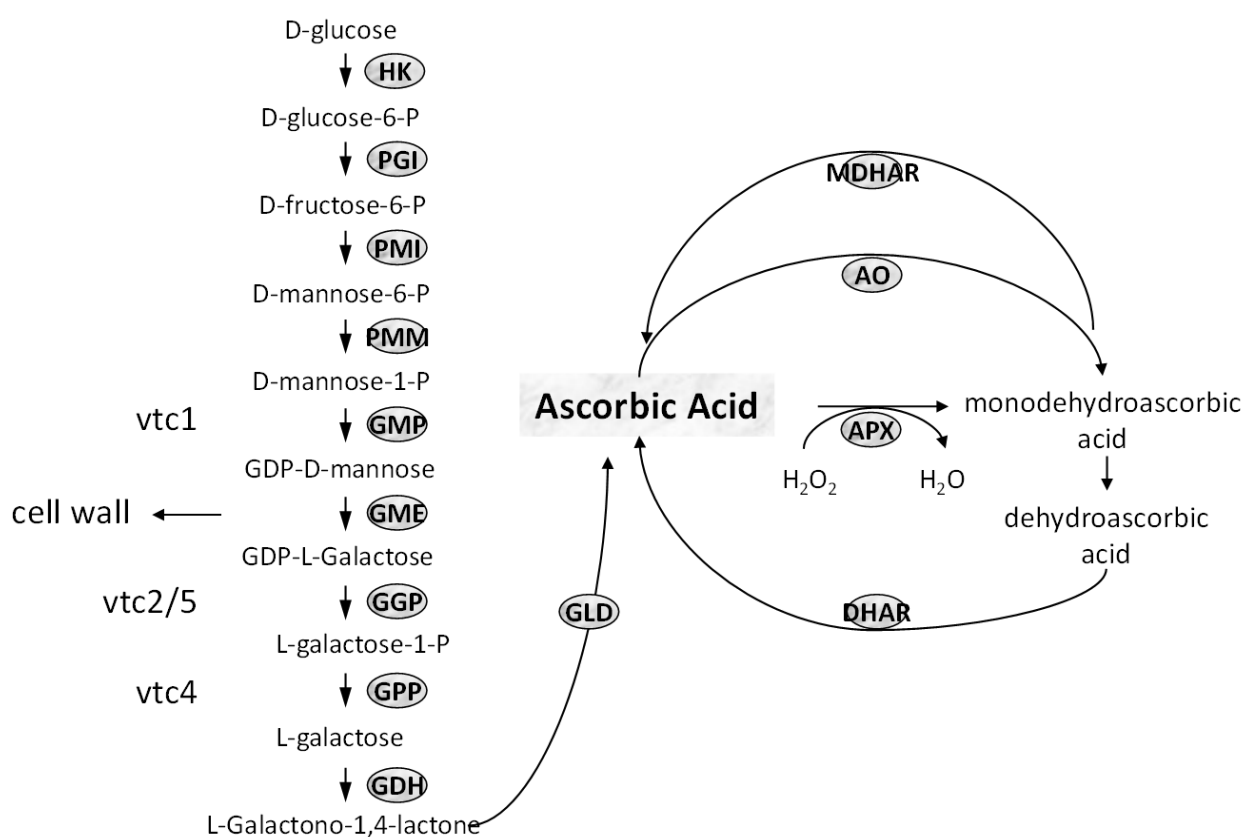


Figure 2

Figure 2: The major pathways of ascorbic acid synthesis (left) and recycling (right) in plants. HK : hexokinase, PGI : phosphoglucose isomerase, PMI : phosphomannose isomerase, PMM, phosphomannose mutase, GMP : GDP mannose pyrophosphorylase (vtc1); GME: GDP mannose-3,5-epimerase; GGT : GDP-L-galactose phosphorylase or L-galactose guanyltransferase (vtc2); GPP: galactose-1-P phosphatase (vtc4); GDH: galactose dehydrogenase; GLD: galactono-1,4-lactone dehydrogenase; MDHAR: monodehydroascorbate reductase; AO: ascorbate oxidase; APX: ascorbate peroxidase; DHAR: dehydroascorbate reductase.

Standard plant growth conditions and sampling

WVa106 plants were grown in a multispan Venlo-type greenhouse, orientated N-S in 51 pots (potting compost P3 Tref, Tref EGO substrates BV) in either Spring (May harvest) or Autumn (November harvest) in Southern France. Plant nutrition and chemical pest and disease control were in accordance with commercial practices. Water was supplied to the plants using a drip irrigation system to maintain 20-30% drainage. Light intensities of 300-700 photosynthetically active radiation (PAR) were obtained over the culture period, a maximum of 700 PAR was obtained on sunny days. Flowers were mechanically pollinated three times a week and side shoots removed as they appeared. Plant material was harvested at solar noon on a sunny day unless otherwise stated. Harvested material was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Prior to the molecular and biochemical analysis plant material was ground in liquid nitrogen. For all physiology experiments a minimum of 5 plants, making 5 biological replicates, per genotype and per condition were used.

Growth of plants under drought stress conditions

To test the impact of drought stress on yield and fruit development (fruit size and ascorbate levels), plants were divided into two equally sized groups (at least 5 plants per genotype). One group was watered normally (maintaining one third drainage) whereas the second group was subjected to water stress by stopping watering for between 24 and 48 hours, or until plants wilted completely, whichever was the sooner. The water stress was applied once a week for four consecutive weeks during fruit ripening on trusses 2 to 5. The stress was monitored by application of sensors to the base of the tomato plant stems linked to a recording device which monitored stem diameter throughout the period of the experiment. Fruits for analyses were harvested directly following the fourth and final application of drought stress.

Construction of RNAi plasmids, tomato transformation and selection of lines

RNAi plasmids for two genes involved in ascorbate metabolism, gene “D” and gene “O” were constructed. Fragments of 500-600 bp were amplified with specific primers (corresponding to the coding region of the two genes) containing Gateway adaptors from cDNA purified from tomato leaf RNA using standard techniques. The PCR products obtained were cloned into vector pDONRTM201 (BP reaction, Gateway according to the manufacturer’s instructions) and afterwards into the destination vector pK7WIWG2(1),0 (Karimi et al., 2002) (LR reaction, Gateway according to the manufacturer’s instructions). These constructs were used to transform *Agrobacterium* strain GV3101. WVa106 tomato cotyledons were transformed based on a previously described method (Hamza and Chupeau, 1993). Leaf tissue was tested for ploidy by flow cytometry (by use of the flow cytometer ‘Ploidy Analyser’, Partec, Germany, according to the manufacturer’s instructions) and for the presence of the transgene by PCR. Plants not containing the transgene and non-diploid plants were eliminated. The lines produced concerned two genes involved in ascorbate metabolism (Figure 2): lines D1 and D2 were independent lines for the same gene and line O1 represented another gene involved in ascorbate metabolism. In all cases, the reduction in expression of the specific gene was checked by RT-PCR or Q-PCR and both genes were found to be significantly under-expressed compared to wild type levels (data not shown).

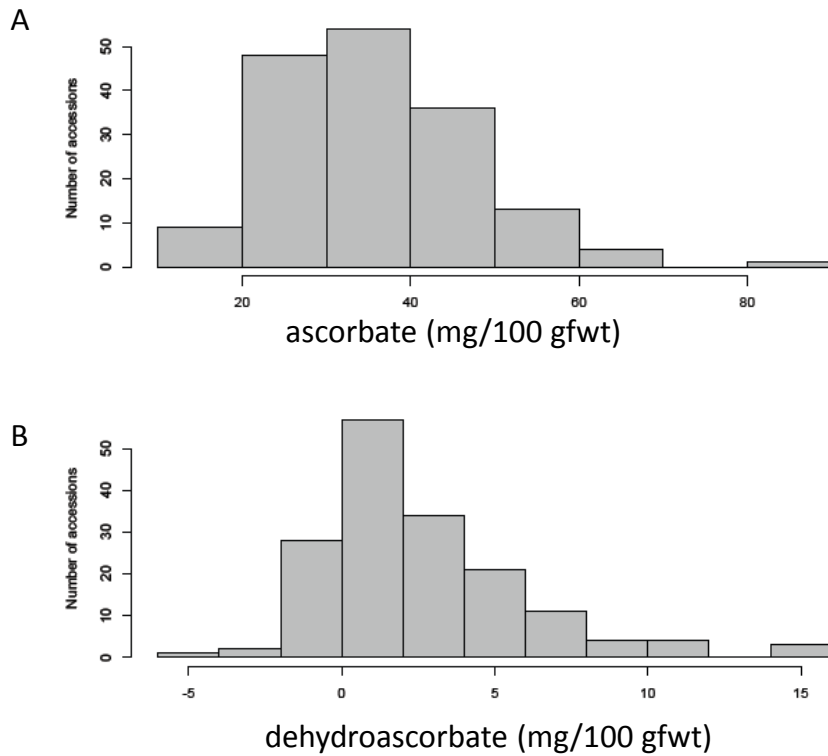


Figure 3

Figure 3: The distribution of ascorbate and dehydroascorbate content in tomato germplasm (170 accessions made up of domesticated and cherry cultivars and wild accessions). Ripe fruit from the accessions grown in Southern France in Summer 2007 were harvested, ground and assayed for ascorbate and dehydroascorbate. The distribution of concentrations in mg/100 g fwt is shown. The negative values for DHA reflect the error present in the assay as little DHA is present in ripe tomato fruits, the ascorbate pool is mostly present in a reduced form.

Ascorbic acid content

Measurements of ascorbic acid content were carried out as described (Stevens et al., 2006) on material conserved at -80°C. Extractions and assays were carried out in ice-cold 6% TCA. The microplate assay used was a spectrophotometric assay based on the detection of dipyrityl-Fe²⁺ complexes following the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ by the reduced form of ascorbate present in the samples and comparison with standards of known concentrations. Total ascorbate (reduced + oxidised forms) was measured by mixing the sample with 5mM DTT, to reduce dehydroascorbate, prior to the assay. Non-specific background fluorescence was eliminated by measuring the absorbance obtained by replacing the DTT with 0.3U ascorbate oxidase. The efficiency of the oxidation was checked on ascorbate standards treated in the same way. All assays were carried out in triplicate.

RESULTS

Variability in tomato fruit ascorbate and dehydroascorbate content

Fruit are a major source of vitamin C, particularly fruit that are regularly consumed such as tomato. However, within germplasm of different species, a wide range of variation in vitamin C levels can be found, which will have an impact on nutritional value and stress tolerance. Ascorbate and dehydroascorbate levels were therefore measured in red or ripe tomato fruit from the core collection described in the Materials and Methods. The results are shown in Figure 3. Tomato fruit ascorbate content and dehydroascorbate (DHA) content are variable in the collection both showing a normal distribution. Fruit ascorbate content shows a range of values of between 10 and 90 mg/100 gfw for ascorbate (Figure 3A) whereas DHA levels vary between 0 and 15 mg/100 gfw (Figure 3B): the low DHA values reflecting the fact that tomatoes were harvested when ripe when the ascorbate pool is almost fully reduced and DHA levels are low.

Application of drought stress to wild type and transgenic plants for genes involved in ascorbate metabolism

As ascorbate is not only a nutritional marker but can play a protective role in plant physiology, particularly under conditions of stress, transgenic plants with altered ascorbate metabolism were produced and subjected to repeated drought stress as described in the Materials and Methods and compared with plants grown under normal conditions. The stem diameter measurements shown in Figure 4 show the fluctuations in stem diameter for a typical wild type plant and a typical plant from each of the transgenic lines (D1, D2 and O1) under control or drought stress conditions. The decrease in stem diameter occurs for all four types of plants during the four points of stress application while it does not appear in the control plants showing that the stress was effective.

Effect of changing expression of genes involved in ascorbate metabolism and imposing drought stress on fruit ascorbate content

Ascorbate content may fluctuate during drought stress or as a result of the transgenic manipulations.

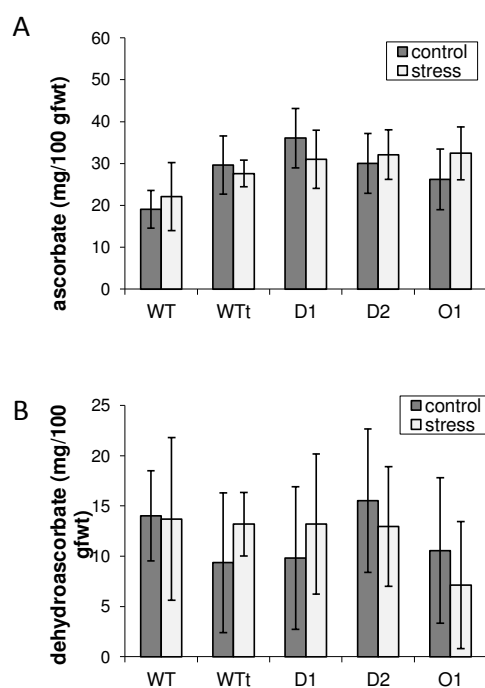
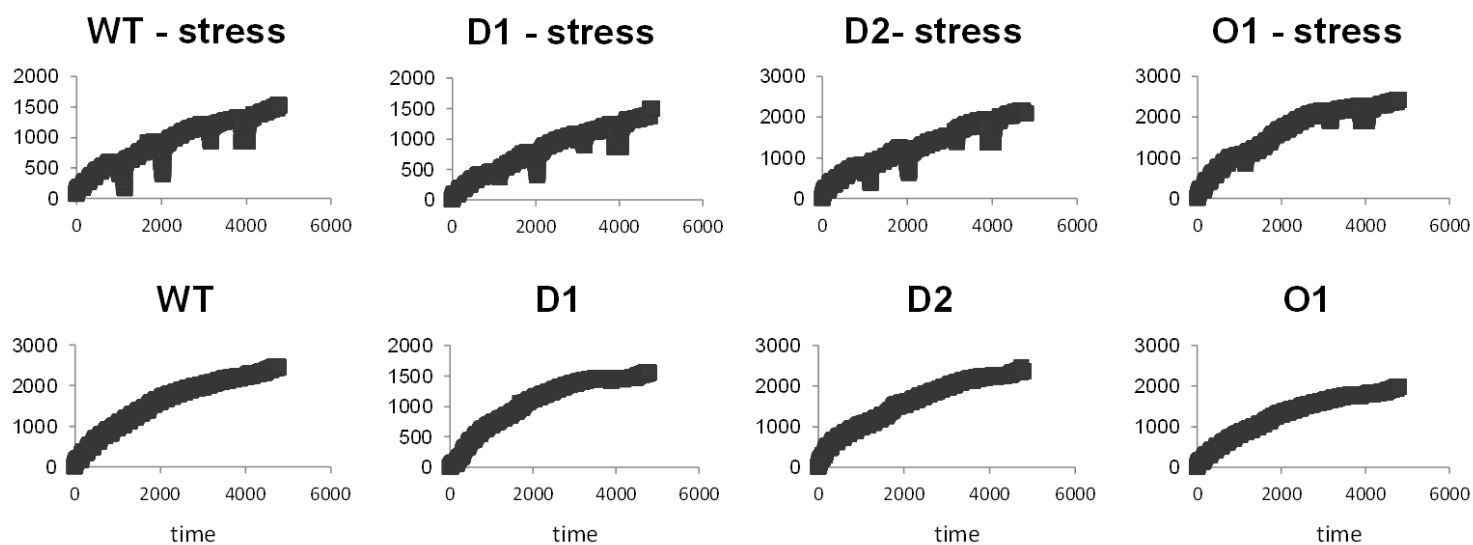


Figure 5: Ascorbate and dehydroascorbate levels in red ripe fruit harvested at the end of the series of drought stress episodes from WT, transformed WT (WTt) and the three transgenic lines (D1, D2, O1). Control fruits were harvested at the same moment from plants that had not been subjected to drought stress. At least 5 plants per genotype per condition were used and a minimum of six fruits per plant were harvested.

Ascorbate and dehydroascorbate levels were therefore measured in ripe fruit grown under control conditions or under drought stress. The results are shown in Figure 5. The alteration of the expression of different genes involved in ascorbate metabolism (transgenic lines D1, D2 and O1) did not have a significant effect on fruit ascorbate content either under control conditions or under the conditions chosen for the repeated drought stress (Figure 5A). Similar results were obtained for fruit DHA levels (Figure 5B).

Under-expression of genes involved in ascorbate metabolism: effects on fruit size and yield under control conditions and following drought stress

Drought stress can have a negative impact on assimilate accumulation and therefore reduce fruit number, size or yield. Fruit size and yield were measured in the wild type and transgenic lines under the two conditions and results are shown in Figure 6. The under-expression of one of the genes involved in ascorbate metabolism has an effect on fruit weight, decreased average fruit weight is seen under both normal and stress conditions for the transgenic lines D1 and D2 (Figure 6A) whereas the line O1, under-expressing a different gene involved in ascorbate metabolism, does not show differences in fruit weight compared to wild type (WT) or the transformed control (WTt). Fruit weight decreases in all lines following drought stress but the effects are the largest for the small fruited lines D1 and D2 which show average decreases in fruit size of 15% and 22% respectively, compared to 9% for the wild type and 4% for the transgenic line O1. The effects of drought stress on total fruit yield were not significant but the transgenic lines D1 and D2, which have smaller fruits, also show smaller yields compared to the control lines (WT and WTt) and the line O1, under-expressing a different gene involved in ascorbate metabolism.

DISCUSSION

Understanding the mechanisms governing plants' adaptation to the environment is a crucial challenge in the light of current issues concerning climate change. The ecological diversity present in populations and germplasm is a vital source of traits and alleles, many of which may have been inadvertently lost during domestication, which enable the plant to adapt to a changing environment, particularly in crop species. As wild species often show more tolerance to environmental stress than their cultivated relatives (Gur and Zamir, 2004), the exploitation of genetic diversity available in tomato is important to develop an understanding of the mechanisms that influence adaptation. In addition it can be used to identify key alleles for future breeding programs, so that this diversity is harnessed to develop stress-tolerant crops in which yield may be maintained under unfavourable environmental conditions.

In this study we have shown that a wide range of ascorbate concentrations are present in a collection of tomatoes representing the global genetic diversity of this fruit (including domesticated cultivars (*S. lycopersicum*), cherry tomato cultivars (*S. l. cerasiforme*) and wild accessions (*S. pimpinelifolium*) that could be useful for breeding for stress tolerance, or improved nutritional quality and as an important source of information necessary for understanding the links between ascorbate content and physiological functions in fruit.

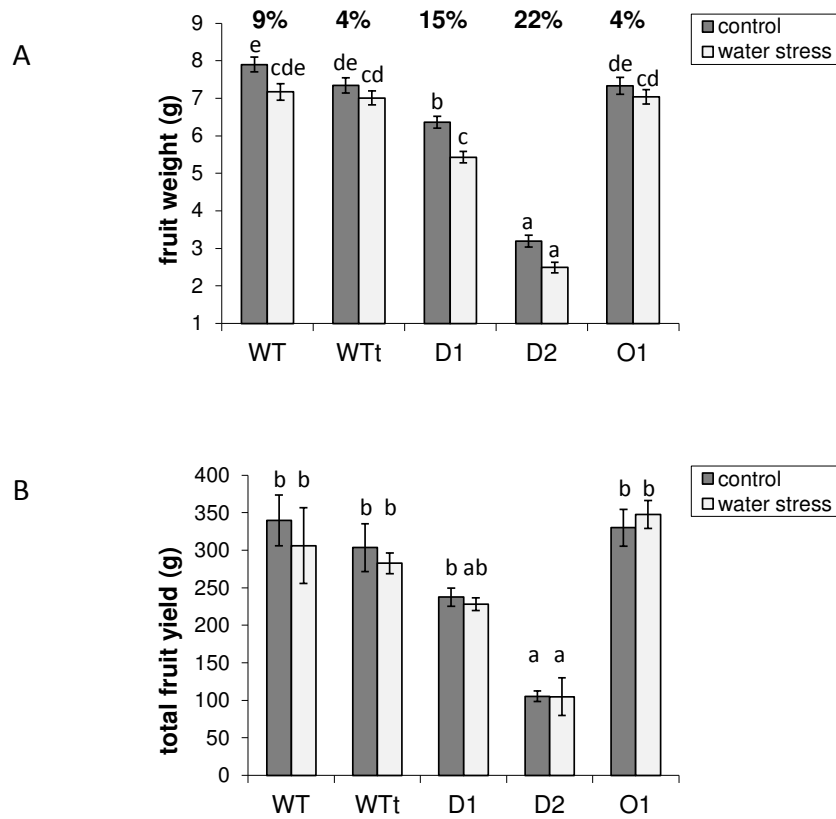


Figure 6

Figure 6: Average fruit weight (all fruits) and total fruit yield of red ripe fruit harvested at the end of the series of drought stress episodes from WT, transformed WT (WTt) and the three transgenic lines (D1, D2, O1). Control fruits were harvested at the same moment from plants that had not been subjected to drought stress. At least 5 plants per genotype per condition were used. Statistical differences between samples were assessed using a Tukey test at 5%.

Antioxidants such as ascorbate are an essential part of the plant's stress tolerance mechanisms and given the multiple roles of this molecule in plants, can act at different levels. Genes involved in ascorbate metabolism have already been shown to have roles in controlling stomatal conductance (Chen and Gallie, 2004; Fotopoulos et al., 2008; Garchery et al., 2013) for example. In this study, one of the two genes chosen has effects on fruit weight particularly under drought stress conditions. More work is required to understand at what level these genes are acting (for example in terms of photosynthesis, carbon fixation and carbon transport to fruit). The effects in red fruits on ascorbate levels are not significantly different to wild type and so several hypotheses need to be tested: (i) the impact of the under-expression of the chosen genes on ascorbate levels may be seen in other tissues (ii) the plant has compensated for the reduced expression of these genes by activating other genes controlling ascorbate levels.

In a previously published study, links have been shown between the activity of an ascorbate oxidase enzyme and yield under different conditions, including water deficit (Garchery et al., 2013). The silencing of this isoform of ascorbate oxidase led to numerous phenotypic differences with wild type plants, including changes in stomatal conductance, sugar metabolism (hexose concentrations in leaves and fruit) and apoplastic ascorbate, sucrose and hexose levels. The expression level of different genes and the activity of enzymes involved in sugar metabolism and the source-sink relationship were also affected. Therefore the activity of enzymes controlling the ascorbate redox state could have wide roles including in carbon metabolism and processes controlling fruit yield under different conditions.

In summary, manipulation of ascorbate metabolism in tomato can have effects beyond being a marker for nutritional quality or stress tolerance traits, as manipulation of enzymes involved in ascorbate metabolism can also affect fruit growth and yield. The diversity in terms of ascorbate metabolism, and probably activity of the enzymes involved in ascorbate metabolism, is therefore an extremely important resource and is useful for several reasons (i) as sources of new alleles to improve fruit nutritional value; (ii) as sources of useful alleles for stress tolerance and adaptation in tomato and finally (iii) to help confirm or refute the correlations found in this study concerning drought tolerance, yield and ascorbate metabolism.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Alain Goujon and the experimental team at INRA, St Maurice for plant management. The PhD of N. Gest was financed by INRA and the region "Provence-Alpes-Côte d'Azur".

Literature cited

- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science*. 218: 443-448.
- Bulley, S.M., Rassam, M., Hoser, D., Otto, W., Schunemann, N., Wright, M., MacRae, E., Gleave, A. and Laing, W. 2009. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanylyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 60: 765-778.
- Chen, Z. and Gallie, D.R. 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell*. 16: 1143-1162.
- Demmig-Adams, B. and Adams, W.W., 3rd 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*. 1: 21-26.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S. and Smirnoff, N. 2007. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal*. 52: 673-689.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Inanaga, S. and Tanaka, K. 2007. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta*. 225: 1255-1264.
- Fotopoulos, V., De Tullio, M.C., Barnes, J. and Kanellis, A.K. 2008. Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *Journal of Experimental Botany*. 59: 729-737.
- Garchery, C., Gest, N., Do, P.T., Alhagdow, M., Baldet, P., Menard, G., Rothan, C., Massot, C., Gautier, H., Aarouf, J., Fernie, A.R. and Stevens, R. 2013. A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. *Plant, cell & environment*. 36: 159-175.
- Gautier, H., Massot, C., Stevens, R., Serino, S. and Genard, M. 2009. Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance. *Annals of Botany (Lond)*. 103: 495-504.
- Gest, N., Garchery, C., Gautier, H., Jimenez, A. and Stevens, R. 2013a. Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant biotechnology journal*. 11: 344-354.
- Gest, N., Gautier, H. and Stevens, R. 2013b. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of experimental botany*. 64: 33-53.
- Gest, N., Page, D., Birtic, S., Gouble, B., Gilbert, L., Garchery, C., Causse, M. and Stevens, R. 2010. Response of the fruit antioxidant system to the post-chilling period in two different tomato lines. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 4: 76-83.
- Green, M.A. and Fry, S.C. 2005. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*. 433: 83-87.
- Gur, A. and Zamir, D. 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biology*. 2: e245.
- Hamza, S. and Chupeau, Y. 1993. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and agrobacterium-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Experimental Botany*. 44: 1837-1845.
- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P. and Zhang, L. 2005. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental Botany*. 56: 3041-3049.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*. 7: 193-195.
- Kwon, S.Y., Choi, S.M., Ahn, Y.O., Lee, H.S., Lee, H.B., Park, Y.M. and Kwak, S.S. 2003. Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *Journal of Plant Physiology*. 160: 347-353.

- Massot, C., Stevens, R., Genard, M., Longuenesse, J.J. and Gautier, H. 2012. Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta*. 235: 153-163.
- Morison, J.I., Baker, N.R., Mullineaux, P.M. and Davies, W.J. 2008. Improving water use in crop production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 363: 639-658.
- Muller, B., Pantin, F., Genard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M. and Gibon, Y. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany*. 62: 1715-1729.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniwi, J., Alvarez, M.E. and Foyer, C.H. 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 139: 1291-1303.
- Prescott, A.G. and John, P. 1996. Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 245-271.
- Prudent, M., Bertin, N., Genard, M., Munos, S., Rolland, S., Garcia, V., Petit, J., Baldet, P., Rothan, C. and Causse, M. 2010. Genotype-dependent response to carbon availability in growing tomato fruit. *Plant, Cell & Environment*. 33: 1186-1204.
- Prudent, M., Causse, M., Genard, M., Tripodi, P., Grandillo, S. and Bertin, N. 2009. Genetic and physiological analysis of tomato fruit weight and composition: influence of carbon availability on QTL detection. *Journal of Experimental Botany*. 60: 923-937.
- Ranc, N., Munos, S., Santoni, S. and Causse, M. 2008. A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology*. 8: 130.
- Stevens, R., Buret, M., Duffe, P., Garchery, C., Baldet, P., Rothan, C. and Causse, M. 2007. Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology*. 143: 1943-1953.
- Stevens, R., Buret, M., Garchery, C., Carretero, Y. and Causse, M. 2006. Technique for rapid, small-scale analysis of vitamin C levels in fruit and application to a tomato mutant collection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 6159-6165.
- Stevens, R., Page, D., Gouble, B., Garchery, C., Zamir, D. and Causse, M. 2008. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, Cell & Environment*. 31: 1086-1096.
- Yamamoto, A., Bhuiyan, M.N., Waditee, R., Tanaka, Y., Esaka, M., Oba, K., Jagendorf, A.T. and Takabe, T. 2005. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1785-1796.

Influence of temperature and ascorbate-recycling in tomato fruits on the ascorbate pool and ascorbate-degradation products



Vincent Truffault^{1,2}
Rebecca Stevens¹
Guy Costagliola²
Hélène Gautier²



Context:

Ascorbate is a powerful antioxidant in plants. Ascorbate pool size depends on its **biosynthesis, recycling and degradation rates**; these are under **genetic control** and closely related to **environmental conditions**.

Degradation of ascorbate (Green and Fry, 2005) in plants could lead to **oxalate, threonate** or **tartaric acid** accumulation and is species related. AsA is degraded to tartarate in grapes (Melino, 2009), to threonate in lemon pelargonium (Helsper, 1982). These molecules have been poorly studied in **tomato**.

Objectives:

A) How does temperature affect ascorbate degradation products ?

B) What is the impact of a limiting turnover of the ascorbate pool on degradation products ?

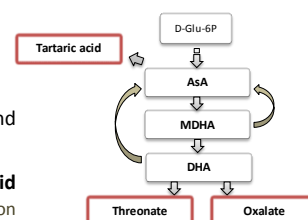


Fig1. AsA degradation products: Oxalate and threonate accumulation occurs via DHA; tartaric acid via AsA



Materials & Methods:

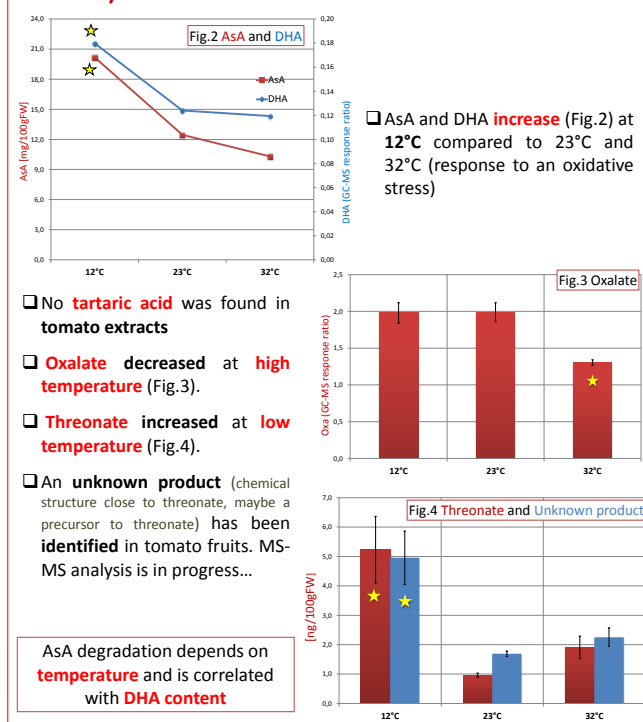
Transgenic lines silenced for an MDHAR gene in a *Solanum lycopersicum* L. cv West Virginia 106 have been generated (Gest, 2012).

Mature green fruits were harvested and placed in environmental chambers under light at 3 temperatures : **12°C, 23°C or 32°C**

Ascorbate concentration was measured by spectrophotometry. **Degradation products** were assayed by a GC-MS based survey of tomato metabolites.

Significant differences (★) among treatments were assessed using a Fisher (LSD) test ($p < 0.05$).

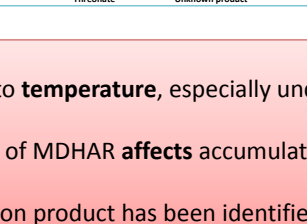
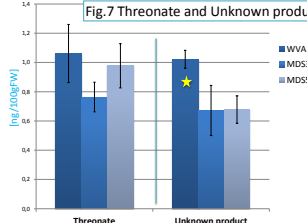
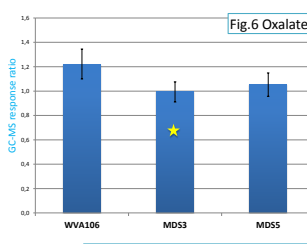
Results A)



Results B)

Preliminary results: Identification of several WVA106 RNAi MDHAR (Fig.5) showing an **increase in AsA content** (Gest, 2012; Haraldsen, 2011)

❑ **MDS3** and **MDS5** are two of these transgenic lines **silenced for an MDHAR gene** (MDHAR activity reduced by 50%)



❑ Transgenic line **MDS3** shows a **decrease** in **oxalate** content compared to wild type (Fig.6).

❑ Concentration of the **unknown degradation product** **decreases** significantly in MDS3 and MDS5 lines (Fig.7).

Lines **underexpressing MDHAR** show differences in the quantities of **ascorbate degradation products**

Conclusions:

- ✓ **Degradation** of ascorbate in **tomato** fruits is closely related to **temperature**, especially under conditions of **oxidative stress**, at 12°C or 32°C.
- ✓ **Limiting turnover** of the ascorbate pool via underexpressing of MDHAR **affects** accumulation of ascorbate degradation products.
- ✓ In addition to **threonate** and **oxalate**, **another AsA degradation product** has been identified (in progress).

References:

- Gest N et al. (2012) Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a MDHAR localized in peroxisomes and the cytosol. Plant Biotechnology Journal
- Green M.A. and Fry S.C. (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. Nature **433**:83-87
- Haraldsen V.M. et al. (2011) Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate in tomato. Plant Physiology and Biochemistry **124**
- Helsper J.P. and Loewus F.A. (1982) Metabolism of L-Threonic acid in *Rumex x acutus* L. and *Pelargonium crispum* (L.) l'Hér. Plant Physiology **69**, 1365-1368
- Melino V.J. et al. (2009) Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. BMC Plant Biology **9**:145

¹ – INRA, GAFL, Avignon, France
<http://w3.avignon.inra.fr/gafl/>
² – INRA, PSH, Avignon, France
<http://www4.paca.inra.fr/psl>

ANNEXE 3

blast_best_hit	probe_id	X	Mean. AO	Mean.MD HAR	Mean. WT	SE.A O	SE.MDH AR	SE. WT	FC.WT AO	FC.WT MD	FC.AO MD
Solyc12g04316 0.1.1	SGN- U2129 97	Unknown Protein	14,45	10,12	12,20	0,20	0,06	0,13	4,75	-4,23	20,09
Solyc04g08121 0.2.1	SGN- U2222 29	Calmodulin binding protein IQ	11,69	7,99	9,94	0,11	0,03	0,07	3,36	-3,86	13,00
Solyc12g03912 0.1.1	SGN- U2145 23	40S ribosomal protein S19-like	12,27	8,66	10,71	0,18	0,16	0,11	2,96	-4,15	12,27
Solyc01g11068 0.2.1	SGN- U2166 14	Auxin-induced SAUR- like protein	11,18	8,22	9,78	0,17	0,05	0,06	2,64	-2,96	7,80
Solyc06g00721 0.2.1	SGN- U2142 86	Unknown Protein	11,52	8,64	10,17	0,36	0,03	0,13	2,55	-2,88	7,34
Solyc03g11430 0.2.1	SGN- U2179 23	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	11,22	8,38	9,71	0,13	0,04	0,03	2,84	-2,51	7,15
Solyc03g11285 0.2.1	SGN- U2139 75	60S ribosomal protein L44	12,65	10,27	11,50	0,23	0,18	0,13	2,22	-2,34	5,19
Solyc01g09611 0.2.1	SGN- U2226 06	WD repeat protein	11,95	9,58	10,79	0,14	0,07	0,05	2,23	-2,32	5,17
Solyc04g05481 0.2.1	SGN- U2132 54	Pollen allergen Phl p 11	12,18	10,02	11,38	0,12	0,11	0,15	1,74	-2,56	4,46
Solyc02g08774 0.2.1	SGN- U2163 24	Cupin RmlC-type	10,54	8,39	9,49	0,11	0,20	0,17	2,07	-2,14	4,44
Solyc12g09622 0.1.1	SGN- U2134 99	60S ribosomal protein L7	11,25	9,15	10,23	0,15	0,11	0,06	2,03	-2,12	4,29
Solyc03g11087 0.2.1	SGN- U2149 68	Unknown Protein	10,55	8,57	9,56	0,21	0,11	0,07	1,99	-1,99	3,95
Solyc08g07911 0.2.1	SGN- U2161 94	Pentapeptide repeat	10,20	8,30	9,32	0,17	0,03	0,06	1,83	-2,04	3,72
Solyc05g01216 0.2.1	SGN- U2150 89	Nitrilase associated protein-like (Fragment)	9,81	8,27	9,18	0,03	0,01	0,10	1,54	-1,88	2,90
Solyc04g07162 0.2.1	SGN- U2131 04	ASR4 (Fragment)	11,98	10,44	11,11	0,11	0,05	0,04	1,82	-1,59	2,90
Solyc02g09009 0.2.1	SGN- U2172 78	TPR domain containing protein	9,34	8,02	8,76	0,04	0,02	0,02	1,50	-1,67	2,50
Solyc03g02602 0.2.1	SGN- U2185 23	Heat stress transcription factor-type, DNA- binding	9,69	8,39	9,05	0,04	0,01	0,06	1,56	-1,58	2,46
Solyc03g06294 0.2.1	SGN- U2175 44	Peroxisomal targeting signal 2 receptor	11,30	10,03	10,42	0,09	0,03	0,04	1,83	-1,31	2,41
Solyc11g06953 0.1.1	SGN- U2145 34	Kinase-START 1 (Fragment)	11,54	10,37	10,91	0,07	0,03	0,06	1,54	-1,46	2,25
Solyc04g00797 0.2.1	SGN- U2128 36	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	13,49	12,66	12,95	0,03	0,03	0,05	1,46	-1,22	1,78
Solyc04g01136 0.2.1	SGN- U2154 06	Ras-related protein Rab- 8A	8,82	8,23	8,54	0,01	0,01	0,02	1,21	-1,24	1,50

RESUME

Le métabolisme de l'ascorbate et plus principalement le statut redox du pool d'ascorbate sont impliqués dans la tolérance au stress et dans les processus primaires de croissance et de développement de la plante. La teneur et le statut redox de l'ascorbate chez les plantes sont régulés par (i) ses voies de biosynthèse, (ii) par le cycle ascorbate-glutathion permettant le recyclage des formes semi-oxydées et oxydées de l'ascorbate et (iii) par sa dégradation, l'ensemble de ces processus étant sous le contrôle de l'environnement. Au cours de ce travail de thèse, des méthodes de transgénèse nous ont permis d'identifier, chez différents génotypes de tomate à petit et gros fruits, les bouleversements physiologiques et métaboliques permettant de compenser des modifications de l'activité des enzymes monodéhydroascorbate réductase (impliqué dans le cycle ascorbate-glutathion) et ascorbate oxydase. Nous avons observé d'importantes modifications phénotypiques altérant le rendement en fruits de la plante sous conditions de culture pouvant générer un stress et également en condition normale de culture. Des liens entre l'activité des enzymes précités avec le métabolisme des sucres, la photosynthèse et la conductance stomatique sont révélés. Le déséquilibre entre les activités oxydantes et réductrices de ces enzymes constitue la première étape vers une dégradation de l'ascorbate. Le taux de dégradation se révèle très faible à la lumière, tandis qu'à l'obscurité une forte accumulation des produits de dégradation l'oxalate, le thréonate ainsi que l'oxalyl-thréonate est observé dans les feuilles de tomate. Enfin, l'activité de l'enzyme MDHAR est corrélée au taux de dégradation à l'obscurité. Les travaux de cette thèse mettent en avant l'importance du statut redox du couple ascorbate / monodéhydroascorbate dans les processus de croissance cellulaire et entre dans la régulation du rendement chez la tomate, et influe la dégradation de l'ascorbate.

Mots clés : statut redox, recyclage et dégradation de l'ascorbate, croissance cellulaire, rendement, impact de l'environnement, tomate.

ABSTRACT

Ascorbate metabolism and particularly ascorbate redox status are involved in stress tolerance and growth processes of plant cells. The concentration of ascorbate and its redox status are under control of (i) its biosynthetic pathways, (ii) the ascorbate-glutathione cycle allowing recycling of semi-oxidized and oxidized forms of ascorbate and (iii) its degradation rate. These processes are under environmental control. Transgenic lines modified for the activity of monodehydroascorbate reductase (involved in ascorbate-glutathione cycle) and ascorbate oxidase were generated in cherry and large-fruited genotypes of tomato. Physiological and metabolic modifications related to the modification of these enzyme activities were studied. We observed large phenotypic alterations that affected fruit yield under both stress conditions and normal growth conditions. Links between ascorbate recycling and sugar metabolism, photosynthesis and stomatal conductance were also revealed. An imbalance between the oxidizing and reducing activities of these enzymes is the first step leading to ascorbate degradation. We have shown that the degradation rate was very low under light, whereas under darkness the degradation compounds oxalate, threonate and oxalyl-threonate accumulated in tomato leaves. Also, the degradation rate is correlated with MDHAR activity. These results highlight the crucial role of the redox status of the ascorbate / monodehydroascorbate couple in growth processes and yield stability in tomato, and the impact on ascorbate degradation.

Keywords: ascorbate redox status, ascorbate recycling and degradation, cell growth, yield, environment parameters, tomato.